



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA

Isoformes de pl de la lipoproteïna lipasa: Origen, distribució i funció

Pere Carulla i Sanmartí



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 3.0. Spain License.**

Departament de Bioquímica i Biomedicina Molecular

Facultat de Biologia

Universitat de Barcelona

**Isoformes de pI de la lipoproteïna
lipasa:
origen, distribució i funció**

Pere Carulla i Sanmartí

Barcelona, 2017

Als meus pares

Només puc començar els agraïments recordant les classes de Regulació del Metabolisme, les reunions al despatx del Dr. Miquel Llobera (*parla'm de tu* diu immediatament) i la proposta de fer una estada d'estiu al grup. A partir d'aquest moment, ja vam iniciar aquest projecte en què hi han intervingut tantes i tantes persones. Bé, amb tants anys invertits ja toca que pugui agrair a tanta gent aquest treball!

Principalment he de parlar de la Dolores i el Miquel. Tots dos han estat el pal de paller de la meva formació. Han tingut paciència (perquè és la mare de la ciència) i no han llençat mai la tovallola, m'han ensenyat a ser constant i a "reposar i repassar". M'emporto un munt d'experiències, tics (*¿no te habrás equivocado?, en parlem?*), el seny (*Miquel, ahora no*) i la rauxa (*todo al rojo*). Però també he de parlar d'ells com el Miqui i la Lola, que sempre s'han definit com els meus pares científics. Amb ells he tingut converses més enllà del tema purament científic, gairebé sermons! S'han preocupat per mi i m'han ajudat des de la seva experiència com a pares. Moltes gràcies per aquestes dues facetes.

Seguim amb la gent del laboratori. Al David, el far del laboratori. Sempre present i disposat a donar un cop de mà, sobretot si és una consulta de l'Apo A-IV. Com l'Eva, jo també espero treballar amb tu molts anys més.

A l'Albert li he d'agrair des de la línia d'investigació fins al suport a distància ofert. Amb una paciència infinita, ha tingut resposta per a totes les preguntes, fins per les més extravagants.

De l'Eva, en diré que ha estat amb qui he passat les tardes més surrealistes al laboratori: capses de cartró, capes lipídiques, converses frikis, estius d'ELISA infinites, i en menor mesura, el japonès, els anime, i la literatura... això no li ha restat mai estar a disposició per a qualsevol pregunta o dubte que ella pogués respondre!

A la Míriam, companya de viatge en tot això! Ja veuràs com en quatre dies estaràs tu també escrivint els teus agraïments. Has estat una capsa de sorpreses, sobretot a l'hora d'inventar-te frases fetes. Per exemple, un dia em vas dir que *era un chuchurrero* (enlloc de "zizaño"). Increïble.

També he de parlar de la Júlia, que sempre ha estat disposada i amb alguna idea per desencallar alguna situació experimental complicada. A la Marian i al David, per la feina feta i per l'oportunitat de treballar en equip. I del grup, a tantes persones que han passat: Anna (encara parlarem molt amb tu!) i Laura, Darkthur, Gerards, etc.

Finalment i no per això menys important, agrair a la Joana que aparegués al grup. El nostre inici ja va marcar una relació molt... curiosa (*maniàtic vs porca*). En base a això res podia anar malament! Converses, tardes de xarrera, cerveses i dinars japos, partides i *memes* de llúdrigues,...

Fora del grup però al departament, vull parlar dels MPLIns! Mireia, Anna, Sara, Albert, Kashu i Xicu. Vosaltres heu estat l'altre grup de recerca! I si no, pregunteu-li a l'Antonio si era o no un doctorand seu. A tots us vull agrair els debats científics o

no, els correccases, els descansos i les visites. M'heu fet sentir com un més de vosaltres. Sara, estic absolutament convençut de la decisió que vaig prendre. Per cert, espero cedir el meu títol de doctorand més vell del departament.

L'Ingrid ha estat un descobriment tardà. Però també ha estat un gran descobriment! Tot i que m'ha causat algun empatx per dolços, els tes de Sri Lanka i les converses de vacances han ajudat molt! Si jo ho he aconseguit, segur que tu també ho aconseguiràs (i amb notes excel·lents!). Seràs un gran professional. Et dec un detall d'aquest estiu.

De la facultat, he d'agrair la col·laboració de la Unitat Radiològica i del Servei d'Estabulari. També he de citar a Mixestat (al Jorge) per la seva paciència i ajuda per enfocar els resultats d'una manera més comprensible i fer-ne una anàlisi estadística més adequada. També a en Sergi Civit, del Departament d'Estadística de la Facultat de Biologia, pel suport prestat. A la Sílvia Barceló i la Carolina de la Torre, de l'IDIBELL, pels consells d'anàlisi proteòmica.

Però, realment, tota aquesta feina no hauria estat possible sense la col·laboració del laboratori de proteòmica del CSIC-UAB. Des del descobriment d'aquesta línia de treball, hem pogut gaudir del suport i assessorament de la Montse Carrascal i en Joaquín Abián, la Vanesa Casas, l'Edita Bueno i en Rober Pinto.

Una part molt important d'aquesta feina s'ha pogut fer gràcies a l'ajuda i col·laboració de BioSystems. La Montse, la Inma i la Jessy, totes vestides amb el mono blanc, totes idèntiques aleshores, van facilitar la nostra feina sense rondinar ni quan el Miquel ballava valsos a la petita sala de necròpsies.

L'Ana Belén també coneix bé part d'aquesta tesi: els viatges des de l'Hospitalet ens han anat molt bé. Gràcies.

Al Petraki vull agrair una visió diferent de molts aspectes de la vida: de la ciència (no des de l'*acadèmia*), de la cultura, de l'esport, etc. per poder discutir de tot i parlar-ne. Gràcies a tu també per la confiança.

I ens queda parlar de la gent de la carrera. El dinar dels dimecres amb la Senda, la Laia, la Sílvia i la Gemma va ser el dinar de les converses sobre mosques amb les meves amigues i de gent que *no gira rodó*, el moment de parlar de penes i glòries. Però sobretot de riure. Senda, et mereixes una menció especial pel seguiment i ajuda en la tesi. No cal que et digui que vas fer comentaris molt encertats.

També he d'agrair als BioAMPA (Carlota, Joan, Jordi, Lara, Flamencu, Maria, Marta, Nadet, Pablo, Pau, Raquel, Fito, Toni i Zaida) el suport incondicional i la preocupació. Al final, ja no sabíeu si preguntar o no. Cadascú a la seva manera ha contribuït en aquest projecte.

La Caterina també ha de constar als agraïments: tants anys de germana cosina i de peronera han servit perquè aquest escrit gairebé el podries haver fet tu! *Mireu quin caramull de llunes blanques!*

Finalment, vull agrair a la família el sempre estar disponibles i no rendir-se i rondinar mai: Arnau i Anna, Mercè i Marc i Olga. Però sobretot al meu pare i a la

meva mare. Per l'oportunitat de poder completar aquesta recerca, aquest procés. Sense el seu suport, en tots els sentits possibles de la paraula, això pràcticament no hauria ni començat. Vosaltres dos podreu intervenir i fer preguntes sobre les *heparines*, us ho heu guanyat. Pare i Mercè, moltes gràcies per la correcció, heu fet un esforç titànic que no té preu (en hores de cangur).

Moltes gràcies a tothom. Segur que em descuido a persones que han intervingut en menor o major manera en aquesta Tesi. Simplement, moltes gràcies a tots.



I. INTRODUCCIÓ	1
La lipoproteïna lipasa	3
Isoformes de punt isoelèctric	24
II. OBJECTIUS GENERALS	29
III. RESULTATS	33
Distribució de les isoformes de pI de l'LPL	35
Funció de les isoformes de pI de l'LPL	95
Origen de les isoformes de pI de l'LPL	153
IV. DISCUSSIÓ GENERAL	173
V. CONCLUSIONS	181
VI. MATERIALS I MÈTODES	185
VII. BIBLIOGRAFIA	231

Índex de taules i figures.....	xi
Sigles i abreviatures	xvii
I. INTRODUCCIÓ	1
La lipoproteïna lipasa.....	3
1. Característiques generals.....	3
1.1. Descobriment	3
1.2. Funció i localització	3
2. Característiques moleculars	5
2.1. El gen	5
2.1.1. La família gènica de les lipases	5
2.2. La proteïna.....	6
2.2.1. Seqüència d'aminoàcids.....	6
2.2.2. Estructura	6
3. Processament intracel·lular i secreció	10
4. Regulació posttraduccional.....	13
4.1. Interacció amb altres proteïnes	13
4.1.1. LMF1	13
4.1.2. Sel1L	15
4.1.3. ANGPTL4	15
4.1.4. GPIHBP1	16
4.1.5. Apolipoproteïnes	16
Apo A-V	17
Apo C-I i Apo C-III.....	17
Apo C-II	17
5. Regulació fisiològica.....	18
5.1. Teixit adipós blanc	18
5.2. Teixit adipós marró.....	19
5.3. Múscul	19
6. Patologies relacionades amb la lipoproteïna lipasa	21
6.1. Hipertrigliceridèmia	22
6.2. Síndrome metabòlica	22
6.3. Aterosclerosi	22
6.4. Malaltia d'Alzheimer	23
Isoformes de punt isoelèctric.....	24
1. Modificacions posttraduccional i isoformes	24
1.1. El cas de l'LPL	25
1.2. Altres proteïnes	26

II. OBJECTIUS GENERALS	29
III. RESULTATS	33
Distribució de les isoformes de pl de l'LPL	35
1. Antecedents	35
2. Objectius específics.....	38
3. Plantejament experimental per a l'estudi de la distribució	39
3.1. Models d'experimentació.....	39
3.1.1. Rata.....	39
Distribució de l'LPL en teixits de rata adulta.....	39
Distribució de l'LPL en teixits de cria de rata.....	39
Obtenció de les mostres	40
3.1.2. Macaco de Java.....	40
Distribució de l'LPL en teixits de macaco	40
Obtenció de les mostres	40
4. Patró d'isoformes de pl de l'LPL en teixits de rata adulta	42
4.1. Demostració d'isoformes per modificacions posttraduccionals.....	42
4.2. Purificació parcial de l'LPL de teixits de rata adulta.....	43
4.3. Anàlisi per 2DE de l'LPL de teixits de rata adulta	48
4.4. Patró d'isoformes de pl de l'LPL en rata adulta.....	50
4.4.1. Comparació dels patrons entre teixits.....	51
Estudi del pl	52
Estudi de l'abundància relativa.....	54
4.5. Discussió: teixits de rata adulta.....	55
5. Patró d'isoformes de pl de l'LPL en teixits de cria de rata	58
5.1. Anàlisi de l'LPL en teixits extrahepàtics de cria de rata.....	58
5.2. Patró d'isoformes de pl de l'LPL en cria de rata	60
5.2.1. Comparació dels patrons entre teixits.....	61
Estudi del pl	62
Estudi de l'abundància relativa.....	63
5.3. Purificació parcial de l'LPL de fetge de cria de rata	66
5.4. Anàlisi per 2DE de l'LPL de fetge de cria de rata	69
5.5. Immunoprecipitació de l'LPL	70
5.5.1. Assajos previs per a la immunoprecipitació.....	71
5.5.2. Immunoprecipitació en matriu de <i>Sepharose</i>	72
IP-1: Suport en columna d'IP.....	72
IP-2: Suport en tub Eppendorf.....	75
IP-3: Suport en columna de purificació d'IgG	76
5.5.3. Immunoprecipitació en matriu metàl·lica	81

IP-4: Suport en tub Eppendorf.....	81
5.5.4. Conclusions de la immunoprecipitació de l'LPL de fetge	83
5.6. Discussió: teixits de cria de rata	83
6. Patró d'isoformes de pl de l'LPL en teixits de macaco de Java	85
6.1. Activitat LPL en teixits de macaco	85
6.2. Purificació parcial de l'LPL de teixit adipós blanc de macaco.....	86
6.3. Anàlisi per 2DE de l'LPL de macaco.....	89
6.4. Patró d'isoformes de pl de l'LPL	90
6.5. Discussió: teixits de macaco	90
7. Conclusions: distribució.....	93
Funció de les isoformes de pl de l'LPL	95
1. Antecedents	95
2. Objectius específics.....	98
3. Plantejament experimental per a l'estudi de la funció.....	99
3.1. Macaco de Java	99
3.1.1. Activitat lipasa i afinitat per l'heparina de les isoformes de pl de l'LPL	99
3.1.2. Obtenció de les mostres	99
3.2. Rata	100
3.2.1. Distribució de l'LPL en teixits de rata adulta en diferents situacions fisiològiques	100
3.2.2. Obtenció de les mostres	101
4. Activitat lipasa de les isoformes de pl de l'LPL de TAB de macaco	102
4.1. Substrat suïcida de lipases.....	102
4.2. Discussió: activitat lipasa de les isoformes	105
5. Afinitat per l'heparina de les isoformes de pl de l'LPL de TAB de macaco.....	107
5.1. Elució en gradient esgraonat.....	107
5.1.1. Purificació parcial de l'LPL.....	107
5.1.2. Anàlisi per 2DE de l'LPL	109
5.2. Elució en gradient constant	109
5.2.1. Purificació parcial de l'LPL.....	110
5.2.2. Anàlisi per 2DE de l'LPL	111
5.3. Discussió: afinitat de les isoformes per l'heparina	112
6. Patró d'isoformes de pl de l'LPL de rata adulta en diferents situacions fisiològiques	114
6.1. Tractaments.....	114
6.1.1. Evolució del pes	114
6.1.2. Efecte sobre l'activitat LPL	115
6.2. Purificació parcial de l'LPL dels teixits dels grups experimentals	116
6.2.1. Grup Control.....	116
6.2.2. Grup Fred.....	119

6.2.3. Grup Dejuni	121
6.2.4. Grup Realimentació	123
6.3. Patró d'isoformes de l'LPL dels teixits dels grups experimentals	124
6.3.1. Estudi del pl	125
DIGE	126
6.3.2. Estudi de l'abundància relativa	129
6.4. Activitat enzimàtica de les isoformes de pl de l'LPL de TAB en dejuni	131
6.5. Caracterització en poblacions de les isoformes de pl de l'LPL de rata.....	133
6.5.1. Gestió de dades	133
6.5.2. Anàlisi descriptiu de les variables	134
Estudi del pl de les isoformes.....	134
Estudi de l'abundància relativa de les isoformes	135
6.5.3. Obtenció de les poblacions (o clústers)	136
Clústers d'isoformes en diferents teixits de rata	141
Clústers d'isoformes en cria de rata	143
Clústers d'isoformes en diferents situacions fisiològiques.....	144
6.5.4. Discussió: poblacions d'isoformes de pl	146
6.6. Discussió: diferents situacions fisiològiques	146
7. Conclusions : funció	152
Origen de les isoformes de pl de l'LPL	153
1. Antecedents	153
2. Objectius específics.....	155
3. Plantejament experimental per a l'estudi de l'origen	156
3.1. Obtenció de la mostra	156
4. Modificacions posttraduccional: glicosilació i fosforilació de l'LPL.....	158
4.1. Glicosilació	158
4.2. Fosforilació.....	160
5. Seqüenciació de l'LPL de macaco de Java.....	162
5.1. Digestió en gel	162
5.2. Digestió en líquid	162
6. Aïllament de les isoformes de pl de l'LPL de macaco de Java.....	166
6.1. Isoelectroenfocament en líquid: resolució teòrica	166
6.2. Isoelectroenfocament en líquid: posada al punt	166
6.3. Discussió: isoelectroenfocament en líquid	169
7. Discussió: origen	170
8. Conclusions : origen.....	172

IV. DISCUSSIÓ GENERAL	173
V. CONCLUSIONS	181
VI. MATERIALS I MÈTODES	185
1. Purificació parcial de l'LPL per a l'estudi de les isoformes	188
1.1. Cromatografia d'afinitat en columnes d'heparina-Sepharose	188
1.1.1. Fonament del mètode.....	188
1.1.2. Reactius.....	188
1.1.3. Aparells	189
1.1.4. Procediment	189
1.2. Determinació de la proteïna total (PNT 0350600 EXP/016)	192
1.2.1. Fonament del mètode.....	192
1.2.2. Reactius.....	192
1.2.3. Aparells	192
1.2.4. Procediment	192
1.3. Valoració de l'activitat lipoproteïna lipasa (PNT 0350600 EXP/013).....	193
1.3.1. Fonament del mètode.....	193
1.3.2. Reactius.....	193
1.3.3. Aparells	193
1.3.4. Procediment	194
1.3.5. Càlculs	195
1.3.6. Descontaminació i gestió dels residus	196
2. Estudi molecular de les isoformes de l'LPL	197
2.1. Precipitació de les proteïnes.....	197
2.1.1. Fonament del mètode.....	197
2.1.2. Reactius.....	197
2.1.3. Procediment	197
2.2. Electroforesi en SDS-PAGE (PNT 0350600EXP/017) (1DE)	198
2.2.1. Fonament del mètode.....	198
2.2.2. Reactius.....	198
2.2.3. Aparells	198
2.2.4. Procediment	198
2.3. Immunodetecció de l'LPL (PNT 0350600 EXP/017) (WB)	199
2.3.1. Fonament del mètode.....	199
2.3.2. Reactius.....	199
2.3.3. Aparells	199
2.3.4. Procediment	200
2.4. Tint de proteïnes amb plata (PNT 0350600 EXP/021) (Ag)	200
2.4.1. Fonament del mètode.....	200
2.4.2. Reactius.....	200

2.4.3. Procediment	200
2.5. Electroforesi bidimensional de l'LPL (PNT 0350600 EXP/020) (2DE)	201
2.5.1. Fonament del mètode	201
2.5.2. Reactius	201
2.5.3. Aparells	202
2.5.4. Procediment	202
2.6. Immunoprecipitació de l'LPL	203
2.6.1. Fonament del mètode	203
Esquematització del funcionament de les immunoprecipitacions	204
IP-1: Suport en columna d'IP	204
Reactius	204
Procediment	205
IP-2: Suport en tub Eppendorf	206
Reactius	206
Procediment	206
IP-3: Suport en columna de purificació d'IgG	207
Reactius	207
Procediment	207
IP-4: Suport en tub Eppendorf i matriu metàl·lica	208
Reactius	208
Procediment	208
2.7. Gel diferencial d'electroforesi 2DE (DIGE)	208
2.7.1. Fonament del mètode	209
2.7.2. Reactius	209
2.7.3. Aparells	210
2.7.4. Procediment	210
2.8. Substrat suïcida de lipases (DABGE)	210
2.8.1. Fonament del mètode	211
2.8.2. Reactius	211
2.8.3. Aparells	211
2.8.4. Procediment	211
2.9. Isoelectroenfocament en líquid (OGE)	212
2.9.1. Fonament del mètode	213
2.9.2. Reactius	213
2.9.3. Aparells	214
2.9.4. Procediment	214
2.10. Deglicosilació de proteïnes	215
2.10.1. Fonament del mètode	216
2.10.2. Reactius	216
2.10.3. Aparells	216
2.10.4. Procediment	216
2.11. Defosforilació de proteïnes	216

2.11.1. Fonament del mètode.....	217
2.11.2. Reactius.....	217
2.11.3. Aparells	217
2.11.4. Procediment.....	217
3. Anàlisi de l'LPL per espectrometria de masses	218
3.1. Digestió de proteïnes.....	218
3.1.1. Fonament del mètode.....	218
Digestió en gel (LP/IT/02-01 i LP/IT/04-02)	218
Digestió en líquid (LP/IT/02-01 i LP/IT/03-02).....	220
3.2. Cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses en tàndem.....	221
3.2.1. Fonament del mètode.....	221
3.2.2. Reactius.....	221
3.2.3. Aparells	221
3.2.4. Procediment.....	221
3.3. Bases de dades.....	222
4. Mètodes estadístics.....	223
4.1. Creació del patró d'isoformes de pI de l'LPL.....	223
4.2. Comparació estadística del patró d'isoformes de pI de l'LPL.....	226
4.2.1. Estudi i comparació dels pI de diferents patrons	226
Anàlisi de la normalitat de residus i homoscedasticitat de variàncies.....	226
Comparació dels pI	228
4.2.2. Estudi i comparació de les abundàncies relatives de les isoformes de pI de l'LPL entre diferents patrons.....	229

VII. BIBLIOGRAFIA

231

Índex de taules i figures

Taula 1. Efecte de diferents hormones sobre l'LPL	18
Taula 2. Modificacions posttraduccionals més importants i comunes.	24
Taula 3. Activitat LPL en diafragma de macaco.....	85
Taula 4. Activitats lipasa en TAB de rata i macaco.	87
Taula 5. Descripció de la distribució de pI de les isoformes de l'LPL.	134
Taula 6. Descripció de la distribució de l'abundància relativa de les isoformes de l'LPL.	136
Taula 7. Correlació entre els paràmetres variables que defineixen els clústers. ...	137
Taula 8. Caracterització i distribució de les isoformes de l'LPL entre diferents teixits segons els clústers de la Figura 81.	141
Taula 9. Variació de pes molecular de l'LPL de macaco pel tractament amb deglicosidasa.	159
Taula 10. Nombre d'aminoàcids seqüenciats en diferents combinacions de tractament enzimàtic.....	164
Taula 11. Abundància relativa de les isoformes de l'LPL en diferents exposicions d'un sol 2DE-WB.	225
Taula 12. Tractament previ dels valors del pI.....	227
Taula 13. Organització dels valors de pI per a l'estudi de la normalitat de residus i l'homoscedasticitat de variàncies.	227

Figura 1. Localització funcional de l'LPL.	4
Figura 2. Comparació de l'organització del gen de l'LPL, la HL i la PL.	6
Figura 3. Localització dels clústers d'unió a l'heparina.....	7
Figura 4. Model molecular de l'LPL.	8
Figura 5. Maduració de l'N-glicosilació de l'LPL en el RE i el complex de Golgi. D ...	11
Figura 6. Síntesi i secreció de l'LPL.....	12
Figura 7. Arbre filogenètic de les lipases.....	14
Figura 8. Proposta d'actuació de la LMF1 en l'estabilització i dimerització de l'LPL.	14
Figura 9 Isoformes de pl de l'LPL de cor de rata.....	26
Figura 10. Purificació parcial de l'LPL per cromatografia d'afinitat d'un únic cor de rata adulta.....	42
Figura 11. 2DE de l'LPL d'un únic cor de rata adulta.....	43
Figura 12. Purificació parcial de l'LPL per cromatografia d'afinitat de diferents teixits de rata adulta.....	45
Figura 13. 1DE de la purificació parcial de l'LPL de múscul de rata adulta.....	46
Figura 14. 1DE de la reserva de l'LPL de diferents teixits de rata adulta.	47
Figura 15. 2DE de l'LPL de diferents teixits de rata adulta.....	49
Figura 16. Patró d'isoformes de pl de l'LPL de teixits de rata adulta.....	50
Figura 17. Distribució de les isoformes de pl de l'LPL de diferents teixits de rata adulta.....	53
Figura 18. Solapament dels intervals de confiança de les isoformes de pl de l'LPL de diferents teixits de rata adulta.....	53
Figura 19. Abundància relativa de les isoformes de pl de l'LPL en teixits de rata adulta.....	54
Figura 20. Comparació de l'abundància relativa de cada isoforma de pl de l'LPL entre diferents teixits.	55
Figura 21. Isoformes de pl de l'LPL de cor de cria de rata.	59
Figura 22. Isoformes de pl de l'LPL de TAM de cria de rata.....	60
Figura 23. Patró d'isoformes de pl de l'LPL de teixits de cria de rata.....	61
Figura 24. Solapament dels intervals de confiança de les isoformes de pl de l'LPL de diferents teixits de cria de rata.	62
Figura 25. Solapament dels intervals de confiança de les isoformes de pl de l'LPL entre cria i adult.	63
Figura 26. Abundància relativa de les isoformes de pl de l'LPL de cor de rata.	64
Figura 27. Comparació de l'abundància relativa de les isoformes de l'LPL de cor de rata.....	64

Figura 28. Abundància relativa de les isoformes d'LPL de TAM de rata.	65
Figura 29. Comparació de l'abundància relativa de les isoformes de l'LPL de TAM de rata.....	65
Figura 30. Purificació parcial per cromatografia d'afinitat de l'LPL de fetge de cria de rata.	66
Figura 31. Inhibició de l'activitat LPL en fraccions de la purificació parcial de l'LPL	67
Figura 32. 1DE de la purificació parcial de l'LPL de fetge de cria de rata.....	68
Figura 33. 2DE de la reserva d'LPL de fetge de cria de rata.....	70
Figura 34. Esquema de l'anàlisi dels punts implicats indirectament en la IP.	71
Figura 35. 1DE de l'LPL de l'anàlisi dels punts implicats indirectament en la IP.	72
Figura 36. IP1 – 1DE de l'LPL immunoprecipitada en columna d'IP.....	73
Figura 37. IP1 – 1DE de l'LPL immunoprecipitada en columnes d'IP: punts de retenció de l'LPL.	74
Figura 38. IP2 – 1DE de l'LPL immunoprecipitada en tubs eppendorf.	75
Figura 39. IP3 – 1DE de l'LPL immunoprecipitada en columnes de purificació d'IgG.	77
Figura 40. IP3 – 2DE de l'LPL immunoprecipitada en columnes de purificació d'IgG.	78
Figura 41. IP3 – Alineament de les isoformes de l'LPL immunoprecipitada en columnes de purificació d'IgG.	79
Figura 42. IP3 – 1DE de l'LPL immunoprecipitada en columnes de purificació d'IgG: saturació de la columna.....	80
Figura 43. IP4 – 1DE de l'LPL immunoprecipitada en suport magnètic.....	81
Figura 44. Activitat LPL en teixits de macaco.....	86
Figura 45. Purificació parcial de l'LPL per cromatografia d'afinitat de TAB visceral de macaco	88
Figura 46. 1DE de la purificació parcial de l'LPL de TAB visceral de macaco.	88
Figura 47. 2DE de la reserva d'LPL de TAB visceral de macaco.....	89
Figura 48. Patró d'isoformes de pl d'LPL de TAB visceral de macaco.....	90
Figura 49. Disseny experimental del tractament per a la resposta a les diferents situacions fisiològiques.	101
Figura 50. 2DE de la reserva de l'LPL de TAB visceral de macaco.....	103
Figura 51. 2DE de l'LPL de TAB visceral de macaco. Mostres enfocades en tires d'IEF de pH 6-11 en 11 cm.....	104
Figura 52. Purificació parcial de l'LPL de TAB visceral de macaco per cromatografia d'afinitat en gradient de NaCl creixent i esgraonat.	107

Figura 53. 1DE de l'elució de l'LPL de TAB de macaco en gradient de NaCl creixent i esgraonat.....	108
Figura 54. 2DE de l'LPL de TAB visceral de macaco eluïda en gradient de NaCl creixent i esgraonat.....	109
Figura 55. Purificació parcial de l'LPL de TAB visceral de macaco per cromatografia d'afinitat per gradient constant.....	111
Figura 56. 2DE l'LPL de TAB visceral de macaco eluïda en gradient de NaCl constant.....	112
Figura 57. Pes corporal en rata després del tractament agut en tres situacions fisiològiques.....	115
Figura 58. Activitat LPL en els teixits de rata adulta segons situació fisiològica.	115
Figura 59. Isoformes de pl de l'LPL de cor de rata del grup "Control".....	117
Figura 60. Isoformes de pl de l'LPL de TAB de rata del grup "Control".	118
Figura 61. Isoformes de pl de l'LPL de TAM de rata del grup "Control".	118
Figura 62. Isoformes de pl de l'LPL de cor de rata del grup "Fred".....	119
Figura 63. Isoformes de pl de l'LPL de TAB de rata del grup "Fred".	120
Figura 64. Isoformes de pl de l'LPL de TAM de rata del grup "Fred"	120
Figura 65. Isoformes de pl de l'LPL de cor de rata del grup "Dejuni".	121
Figura 66. Isoformes de pl de l'LPL de TAB de rata del grup "Dejuni".	122
Figura 67. Isoformes de pl de l'LPL de TAM de rata del grup "Dejuni".	122
Figura 68. Isoformes de pl de l'LPL TAB de rata del grup "Realimentació"	123
Figura 69. Patró d'isoformes de pl de l'LPL de diferents teixits de rata en diferents situacions fisiològiques	124
Figura 70. Solapament dels intervals de confiança de les isoformes de pl de l'LPL de cor de rata en diferents situacions fisiològiques.....	125
Figura 71. Solapament dels intervals de confiança de les isoformes de pl de l'LPL de TAB de rata en diferents situacions fisiològiques.	126
Figura 72. Solapament dels intervals de confiança de les isoformes de pl de l'LPL de TAM de rata en diferents situacions fisiològiques.	126
Figura 73. 2DE de l'LPL de TAB de rata en diferents situacions fisiològiques.	128
Figura 74. 2DE de l'LPL de TAB de rata en diferents situacions fisiològiques.	129
Figura 75. Comparació de l'abundància relativa de cada isoforma de pl de l'LPL de cor de rata adulta en diferents situacions fisiològiques.	130
Figura 76. Comparació de l'abundància relativa de cada isoforma de pl de l'LPL de TAB de rata adulta en diferents situacions fisiològiques.....	131
Figura 77. 2DE de TAB epididimal de rata.	132

Figura 78. Distribució dels pI de les isoformes de l'LPL.	135
Figura 79. Distribució dels valors d'abundància relativa de les isoformes de l'LPL.	136
Figura 80. Criteris d'obtenció dels clústers.	138
Figura 81. Dendrograma de la classificació de les isoformes de pI.....	138
Figura 82. Classificació de les isoformes de l'LPL segons els clústers de la Figura 81.	139
Figura 83. Distribució dels pI de les isoformes de l'LPL segons els clústers de la Figura 81.....	140
Figura 84. Distribució dels valors d'abundància relativa de les isoformes de l'LPL segons els clústers de la Figura 81.	140
Figura 85. Percentatge d'isoformes de l'LPL en cada clúster a partir de la creació dels 3 clústers (Figura 81)..	142
Figura 86. Distribució dels valors d'abundància relativa de les isoformes de l'LPL..	143
Figura 87. Comparació dels valors d'abundància relativa de les isoformes de l'LPL	144
Figura 88. Comparació dels valors d'abundància relativa de les isoformes de l'LPL	145
Figura 89. Purificació parcial de l'LPL de TAB visceral de macaco per cromatografia d'afinitat	157
Figura 90. 1DE de l'LPL de TAB de macaco..	158
Figura 91. 2DE de l'LPL de TAB de macaco amb deglicosidasa.....	160
Figura 92. 2DE de l'LPL de TAB de macaco amb fosfatasa alcalina.	161
Figura 93. Alineament de la seqüenciació de l'LPL de macaco..	163
Figura 94. Resultat teòric de l'OGÉ de l'LPL de TAB de macaco..	166
Figura 95. 1DE de les fraccions de l'OGÉ de l'LPL de macaco amb 50 µg de proteïna	167
Figura 96. 1DE de les tires d'IEF de l'OGÉ de l'LPL de macaco.	167
Figura 97. 1DE de les fraccions de l'OGÉ de l'LPL de macaco amb 100 µg de proteïna.....	168
Figura 98. Sistema de purificació parcial de l'LPL.	191
Figura 99. Electroforesi en SDS-PAGE.....	199
Figura 100. Ettan IPGphor.....	202
Figura 101. Electroforesi bidimensional de l'LPL.	203
Figura 102. Mètodes d'immunoprecipitació.....	204

Figura 103. Imatge obtinguda per la metodologia del 2DE-DIGE.	209
Figura 104. Estructura química del substrat suïcida	211
Figura 105. Esquematització del funcionament de l'OGE..	214
Figura 106. Traçabilitat del pH en assajos 2DE-WB.	224
Figura 107. Determinació de l'abundància relativa de cada isoforma.	225
Figura 108. Exemple de patró d'isoformes d'LPL.....	226

Sigles i abreviatures

1DE	Electroforesi en una dimensió (1-Dimensional Electrophoresis)
2DE	Electroforesi en dues dimensions (2-Dimensional Electrophoresis)
ACN	AcetoNitril
ADMQ	Aigua destil·lada ultrapura (Aigua Destil·lada Mili-Q)
ADNc	Àcid DesoxiriboNucleic complementari
Ag	Tint de proteïnes amb plata
ANGPTL4	Angiopoietin-like 4
Apo	Apolipoproteïna
ARNm	Àcid RiboNucleic missatger
ARP	Sonda de reconeixement d'activitat (Activity Recognition Probe)
BSA	Albúmina sèrica bovina (Bovine Serum Albumin)
BSA FFA	BSA sense àcids grassos (BSA Free Fatty Acids)
CHAPS	Àcid 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylAmmonij]-1-PropanSulfònic
Da	Dalton
DABGE	Substrat suïcida de lipases (Differential Activity-Based Gel Electrophoresis)
DIGE	Gel diferencial d'electroforesi (Difference Gel Electrophoresis)
DTT	DiTioTreitol
EDTA	Àcid etilendiaminotetraacètic (EthyleneDiamineTetraacetic Acid)
GlcNAc	<i>N</i> -Acetilglucosamina
GPIHBP1	GlycosylPhosphatidylinositol-anchored HDL Binding Protein 1
HDL	Lipoproteïna de molt alta densitat (High Density Lipoprotein)
HEPES	Àcid 2-[4(2-HidroxiEtil)-1-Piperazinil]EtanSulfònic
HL	Lipasa hepàtica (Hepatic Lipase)
HPLC	Cromatografia líquida d'alta resolució (High Performance Liquid Chromatography)
HSPG	Proteoglicans de tipus heparan-sulfat (Heparan Sulfate ProteoGlycan)
IAA	IodoAcetAmida
IEF	Isoelectroenfocament (IsoElectroFocusing)
IUBMB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
IPG	Gradient immobilitzat de pH (Immobilized pH Gradient)
kb	kilobases
LC	Cromatografia líquida (Liquid Chromatography)
LDL	Lipoproteïna de baixa densitat (Low Density Lipoprotein)

LMF1	Factor madurador de lipases 1 (Lipase Maturation Factor 1)
LPL	Lipoproteïna lipasa (LipoProtein Lipase)
LRP	Proteïna similar al receptor LDL (Low density lipoprotein receptor-Related Protein)
MS	Espectrometria de masses (Mass Spectrometry)
MS/MS	Espectrometria de masses en tàndem
MW	Pes molecular (Molecular Weight)
NEFA	Àcid gras no esterificat (Non Esterified Fatty Acid)
OGE	Isoelectroenfocament en líquid (Off-Gel Electrophoresis)
pI	p unt Isoelèctric
PIPES	PIP erazine-N,N-bis(2-Ethane S ulfonic acid)
PMF	Mapatge peptídic (Peptide Mass Fingerprinting)
PL	Lipasa pancreàtica (Pancreatic Lipase)
PPAR	Receptor activador de la proliferació peroxisomal (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor)
PROSS	Tampó de dilució de l'OGE (Protein Off-gel Stock Solution)
PTEN	Phosphatase and tension homolog deleted on chromosome 10
PTM	Modificació posttraduccional (PostTranslational Modification)
QM	Q uilo M icró
RE	R eticle E ndoplasmàtic
SDS	Dodecil sulfat sòdic (Sodium Dodecyl Sulfate)
SDS-PAGE	Electroforesi en gels de poliacrilamida amb SDS (SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)
Sel1L	Sel-1 suppressor of <i>lin-12</i> L ike protein
TAB	T eixit A dipós B lanc
TAG	T ri A cil G licerol
TAM	T eixit A dipós M arró
TCA	Àcid tricloroacètic (TriChloroacetic Acid)
TFA	Àcid trifluoroacètic (TriFuoloroacetic Acid)
TNF	Factor de necrosi tumoral (Tumor Necrosis Factor)
VLDL	Lipoproteïna de molt baixa densitat (Very Low Density Lipoprotein)
WB	Immunodetecció de l'LPL per W estern B lot

I. INTRODUCCIÓ



La lipoproteïna lipasa

1. Característiques generals

La lipoproteïna lipasa (**LPL**; EC 3.1.1.34) és un enzim de la família gènica de les lipases, com la lipasa pancreàtica (PL), la lipasa hepàtica (HL) o la lipasa endotelial (Wong and Schotz, 2002). La seva funció està relacionada amb el catabolisme dels quilomicrons (QM) i lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL), ja que causa la hidròlisi de triacilglicèrids (TAG) i fosfolípids continguts en aquestes lipoproteïnes.

1.1. Descobriment

La primera publicació relacionada amb l'LPL és de P. Hahn (1943). En un plasma hiperlipèmic de gos, associat a l'absorció de lípids provinents de la dieta, P. Hahn va descriure l'efecte esclaridor d'un plasma postheparínic. Aquesta evidència, la va relacionar amb un "factor d'aclariment alliberable per heparina", però sense ser capaç de determinar-ne la procedència. No va ser fins al 1954 que es va purificar el "factor d'aclariment alliberable per heparina" a partir de l'homogeneïtzat de cor de rata i que es va parlar de lipoproteïna lipasa (Korn, 1955). L'adopció d'aquest nom es va basar en el fet que el factor d'aclariment actuava sobre emulsions en què s'hi incloïa α -lipoproteïna.

1.2. Funció i localització

La localització funcional de l'LPL és a la llum endotelial dels vasos sanguinis. Des d'aquesta situació, és capaç d'interactuar amb els QM i VLDL circulants provinents de l'intestí (dieta) o el fetge, respectivament. L'enzim és present a la llum endotelial en la seva forma homodimèrica (Osborne et al., 1985) i activa, unit a proteoglicans de tipus heparan sulfat (HSPG) i a la *glycosylphosphatidylinositol-anchored HDL binding protein 1* (GPIHBP1) (Beigneux et al., 2009) (Figura 1).

Totes dues lipoproteïnes (QM i VLDL) estan formades per un nucli hidròfob, el qual conté principalment TAG i èsters de colesterol, i una escorça amfipàtica formada principalment per fosfolípids i apolipoproteïnes. Les apolipoproteïnes (Apo) són proteïnes amb funció de reconeixement amb lligands de superfície cel·lular i cofactors del metabolisme de les pròpies lipoproteïnes. Així, cada tipus de lipoproteïna presenta un conjunt determinat d'Apo (Dallinga-Thie et al., 2016; Julve et al., 2016; Nakajima et al., 2011). L'LPL situada als HSPG de les cèl·lules endotelials interactua amb les Apo de QM i VLDL, a les quals s'uneix per iniciar la seva funció: la hidròlisi dels TAG i diacilglicerols, per generar àcids grassos no esterificats (NEFA) i 2-monoacilglicerols. Dels tres àcids grassos dels TAG, l'LPL només hidrolitza els que estan en posició 1 i 3 (Santamarina-Fojo and Brewer, 1994). A més, està descrit que l'LPL també té activitat fosfolipasa (Bengtsson-Olivecrona and Olivecrona, 1991; Scow and Egelrud, 1976).

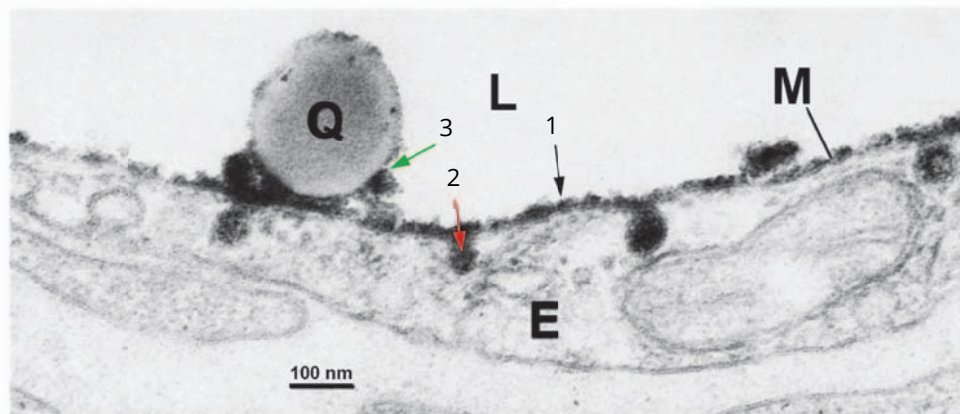


Figura 1. Localització funcional de l'LPL. Imatge obtinguda per microscòpia electrònica mitjançant un assaig immunocitoquímic. L'LPL es localitza a la superfície luminal de l'endoteli (1), a invaginacions de la membrana plasmàtica (2) i associat a una partícula lipídica de la mida d'un quilomicro (Q) (3). E, Endoteli capil·lar; L, Llum del capil·lar; M, Membrana plasmàtica. Adaptada de Pedersen et al. (1983).

Els NEFA produïts són captats per les cèl·lules parenquimàtiques properes (Kampf and Kleinfeld, 2007). La destinació dels NEFA pot variar molt en funció del teixit on s'esdevingui la hidròlisi dels TAG i de la situació fisiològica en què es trobi l'animal. Per exemple, en teixits com ara el cor o el múscul, els NEFA seran utilitzats principalment per a l'obtenció d'energia, mentre que en el teixit adipós blanc (TAB) seran reesterificats i emmagatzemats per a ser alliberats en moments de manca d'ingesta. Per altra banda, en la glàndula mamària alletant, els NEFA seran exportats en forma de TAG per a la producció de llet.

L'acció de l'LPL sobre els TAG de QM i VLDL provoca la reducció del volum d'aquestes lipoproteïnes i que presentin un excés d'elements de l'escorça, els quals se separaran de les lipoproteïnes. Aquestes noves partícules originades a partir de l'escorça, que arrossegueu part del contingut d'Apo de QM i VLDL, són els precursors de lipoproteïnes d'alta densitat (HDL). Per altra banda, els romanents de QM seran captats pel fetge (Cooper, 1997) i les VLDL seran transformades a lipoproteïnes de baixa densitat (LDL), amb una nova configuració d'Apo.

A més de la hidròlisi dels TAG de QM i VLDL, a l'LPL se li atribueixen funcions de reconeixement de partícules circulants i de lligands per a la inclusió i captació de les lipoproteïnes als teixits. Està descrit que la hidròlisi dels TAG es desenvolupa durant un curt període de temps, d'entre 1 i 7 minuts. Mentre la lipoproteïna està immobilitzada mitjançant l'LPL, és quan es du a terme la captació de lipoproteïnes en el teixit (Hultin et al., 2013). Per a aquesta funció, és vital que la plataforma d'interacció entre les lipoproteïnes i els teixits estigui formada per LPL, GPIHBP1 i HSPG. La manca de qualsevol d'aquests elements, redueix dràsticament la captació de lipoproteïnes en els capil·lars (Goulbourne et al., 2014).

2. Característiques moleculars

2.1. El gen

El gen de l'LPL està situat al cromosoma 8p22 en humans, i conté unes 30.000 parelles de nucleòtids (30 kb). La proteïna s'origina a partir de 9 exons, tot i que el gen inclou 10 exons. El nombre de parells de bases entre introns i exons manté una proporció 9/1, típica de gens de mamífers (Deeb and Peng, 1989; Gilbert, 1985). Tanmateix, la longitud mitjana dels exons 1-9 de l'LPL és menor que l'habitual de mamífers.

En humans, el primer exó inclou el pèptid senyal més dos aminoàcids de la seqüència; els següents exons es reparteixen els 1339 nucleòtids restants. El darrer exó, tot i que es transcriu completament, únicament inclou la base amb el codó d'STOP (Deeb and Peng, 1989). En humans, existeixen dues espècies d'ARNm de l'LPL, de 3350 o 3750 parells de bases, segons la poliadenilació de l'extrem 3'. En diverses espècies també existeixen aquestes espècies d'ARNm, excepte en rata, que únicament en presenta una (Kirchgessner et al., 1987; Semenkovich et al., 1989). Aquestes diferències entre ARNm no generen diferències en la traducció de l'LPL.

La seqüència de nucleòtids de l'ADNc de l'LPL entre diferents espècies també ha estat comparada (Raisonnier et al., 1995). Amb l'objectiu d'analitzar la relació entre la seqüència i conservació de dominis entre 8 espècies diferents (humà, porc, vaca, ovella, ratolí, rata, conill porquí i gallina), aquests autors van descriure que totes les espècies comparades han mantingut:

- La seqüència referent a tres estructures (i.e. tríada catalítica, punts d'N-glicosilació i 5 parells de cisteïnes).
- Certa seqüència de nucleòtids que es tradueix en els aminoàcids 46-87 de la proteïna. Aquest tram d'aminoàcids forma una de les nanses β .

Més recentment, el treball de R. Holmes (2011) també compara la seqüència de nucleòtids de diverses espècies (p.e. humans, múrids, diversos primats, gos,...). A banda de descriure la codificació per a fins a 7 llocs d'N-glicosilació potencials entre totes les espècies, apareixen també zones conservades entre les diferents espècies, les quals originen:

- Els tres aminoàcids que componen la tríada catalítica.
- Un domini que cobreix el lloc funcional de la tríada catalítica, el qual contribueix al reconeixement específic del substrat.
- Un domini d'unió a lipoproteïnes.

2.1.1. La família gènica de les lipases

Malgrat que les lipases formin part de la mateixa família, evolutivament, el gen de l'LPL és més proper al gen de la HL que al de la PL: comparteixen gran similitud en estructura d'introns/exons. Per altra banda, la PL té un major nombre d'introns i d'exons (Figura 2) (Kirchgessner et al., 1989). Tanmateix, a partir de models estructurals basats en la PL i la comparació de les seqüències d'ADNc de les tres

lipases (PL, HL i LPL), s'ha arribat a la conclusió que l'expressió i traducció del gen de les diferents lipases inclou sempre unes estructures funcionals força comunes en tots els enzims (van Tilbeurgh et al., 1994).

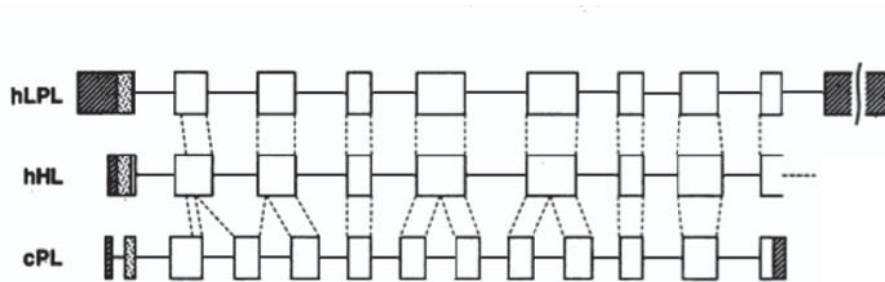


Figura 2. Comparació de l'organització del gen de l'LPL, la HL i la PL. Els exons són representats com a requadres, els introns per línies. Dels requadres, els ratllats són part que no es traduirà, el puntejat serà el pèptid senyal i dels blancs, en resultarà la proteïna madura. LPL i HL humana; PL de gos. Adaptada de Kirchgessner et al. (1989).

2.2. La proteïna

2.2.1. Seqüència d'aminoàcids

En humans, l'ARNm origina una seqüència de 475 aminoàcids (474 en rata i 475 en macaco) (Holmes et al., 2011). Després d'haver eliminat el pèptid senyal, la longitud de l'LPL és de 448 aminoàcids i té un pes molecular (MW) de 50,4 kDa (Senda et al., 1987). Aquesta mateixa proteïna madura presenta un MW d'entre 55 i 60 kDa, i punt isoelèctric (pI) teòric de 8,4. L'estudi sobre el pI de l'LPL es desenvolupa més profundament en l'apartat "1.1. El cas de l'LPL".

2.2.2. Estructura

L'estudi de l'estructura de l'LPL s'ha desenvolupat a partir de l'estructura de la PL, obtinguda per raigs X (van Tilbeurgh et al., 1994), ja que no s'ha aconseguit LPL prou pura ni cristal·litzar-la. A més, la comparació d'ADNc i la seqüenciació de l'LPL bovina (Yang et al., 1989) han completat les fonts d'informació per estudiar indirectament l'estructura de l'LPL. A partir d'aquests resultats, s'ha descrit que la proteïna està organitzada en dos dominis estructurals units per un pèptid flexible:

- **Domini amino-terminal** (inclou els aminoàcids 1-312) és la regió responsable de la catàlisi.
- **Domini carboxi-terminal** (comprèn els residus 313-448) és la regió que comprèn el domini d'unió al substrat.

A més dels dominis amino- i carboxi-tenimals, l'LPL té descrits tot un seguit de dominis funcionals. Aquests dominis poden agrupar conjunts d'aminoàcids de

diferents parts de la proteïna. Els diferents dominis de l'LPL segons la seva funció són:

- **Domini d'unió a l'heparina:** Aquest domini de l'LPL és el que la manté unida als HSPG de la membrana cel·lular, tant de cèl·lules parenquimàtiques com de cèl·lules endotelials. La unió entre LPL i els HSPG (o anàlegs) es basa en forces electrostàtiques entre aminoàcids bàsics de l'LPL (arginina, lisina i histidina) i les cadenes fortament negatives de polisacàrids com l'heparina. Per comparació amb altres proteïnes, s'han descrit 2 seqüències consens d'unió a l'heparina: B-B-X-B i B-X-B-B-X-X-B, en què B és un aminoàcid carregat positivament i X qualsevol aminoàcid petit i neutre. En la seqüència de l'LPL, la majoria de lisines i arginines estan agrupades en quatre clústers. Els tres primers estan localitzats a la regió amino-terminal, mentre que el quart és al domini carboxi-terminal (Figura 3). Mutacions puntuals en alguns d'aquests aminoàcids redueixen significativament la capacitat d'unió a heparina (Hata et al., 1993).

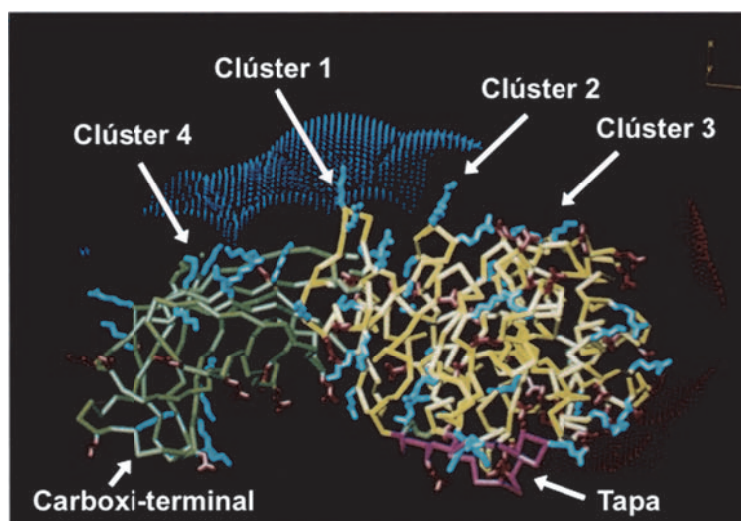


Figura 3. Localització dels clústers d'unió a l'heparina. Representació de l'estructura terciària de la seqüència de l'LPL: domini amino-terminal (groc) i carboxi-terminal (verd), amb el domini tapa (lila) i les cadenes positives d'arginines i lisines (en blau). Adaptada de van Tilbeurgh et al. (1994).

- **Centre actiu:** Inclou tres aminoàcids (Ser132, Asp156 i His241) de la part amino-terminal, anomenats "la tríada catalítica". En les diferents comparacions, aquest és un caràcter molt conservat entre lipases (van Tilbeurgh et al., 1994) i entre espècies (Holmes et al., 2011; Raisonnier et al., 1995). La mutació de qualsevol d'aquests tres aminoàcids, encara que sigui una mutació conservada, causa la pèrdua d'activitat LPL, però no afecta a altres característiques com l'afinitat per l'heparina o la unió a lípids (Emmerich et al., 1992).
- **Domini tapa:** Aquest domini diferencia la forma activa/inactiva de l'LPL. En entrar en contacte amb les lipoproteïnes, la tapa es reorganitza i deixa més exposades regions hidrofòbiques de la seqüència d'aminoàcids i la tríada

- catalítica (Dugi et al., 1992). La tapa és un element important a l'hora del reconeixement del substrat enzimàtic.
- **Domini d'unió a lípids:** Situat al domini carboxi-terminal (Wong et al., 1991), conté a la seva seqüència quatre aminoàcids hidrofòbics (fenilalanina i triptòfan) que afavoreixen la interacció amb lipoproteïnes. De fet, la mutació de dos dels aminoàcids del domini (Trp393 o Trp394) per altres neutrals (alanina), provoca la pèrdua d'unió de l'LPL a lipoproteïnes (Williams et al., 1994).
- **Domini d'unió a Apo C-II:** Aquesta apolipoproteïna està descrita com un cofactor de l'activitat LPL (Bengtsson and Olivecrona, 1982; Goldberg et al., 1990). En quimeres de HL i LPL, es descriu que aquest domini està localitzat a la part amino-terminal (Wong et al., 1991).
- **Domini d'interacció entre monòmers:** Per tal que l'LPL sigui estable, cal que estigui formant dímers d'LPL. D'altra banda, el monòmer perd ràpidament la seva activitat LPL (Osborne et al., 1985). Aquests homodímers estan organitzats de tal manera que el domini amino-terminal està en contacte amb el domini carboxi-terminal de l'altre monòmer (*head-to-tail*) i no com a imatge especular (*head-to-head*) (Figura 4) (Kobayashi et al., 2002; Wong et al., 1997). Tot i no haver descrit els punts exactes implicats en la formació del dímer, els aminoàcids Ala176, Gly188 i Gly195 són essencials per a la dimerització i estabilització del la proteïna (Hata et al., 1992). A més, la regió inclosa entre els aminoàcids 410 i 438 conté estructures vitals per al manteniment de l'estabilitat entre monòmers d'LPL (Keiper et al., 2001; Previato et al., 1994).

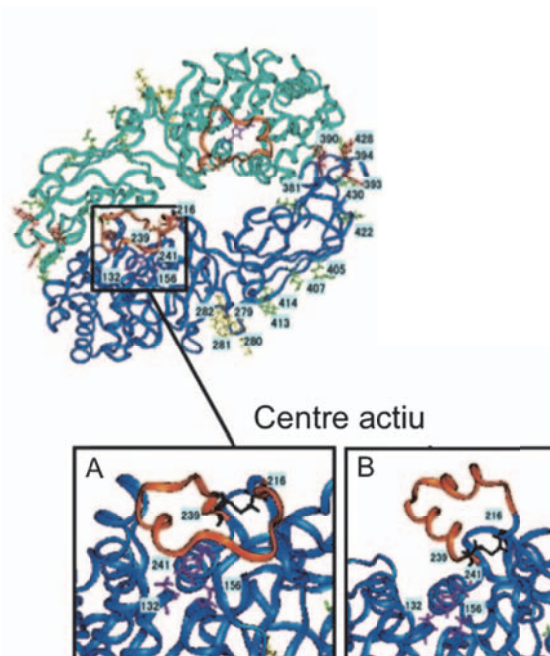


Figura 4. Model molecular de l'LPL. Imatge del dímer d'LPL en l'organització "head-to-tail": cada subunitat presenta un color diferent. Amplificació del centre actiu (aminoàcids 132, 156 i 241, de color morat) i el domini tapa (de color taronja), ja sigui en la configuració "tancat" (A) o "obert" (B). Adaptada de Kobayashi et al. (2002).

- **Domini d'unió a LRP:** L'LPL és un dels elements de pont en la retirada de romanents de QM i LDL. Aquesta retirada es du a terme, principalment en fetge, a través del *low density lipoprotein receptor-related protein* (LRP). L'LPL unida a VLDL i QM és arrossegada pel torrent sanguini fins entrar en contacte amb el receptor LRP a través de l'extrem carboxi-terminal. Per diferents estudis, els aminoàcids 378-423 (Nykjaer et al., 1994) i en especial la Lys407 (Williams et al., 1994) han estat determinats com a part de reconeixement entre l'LPL i l'LRP.

A banda dels diferents dominis funcionals de l'LPL, també estan descrites dues característiques molt conservades en la seqüència d'aminoàcids:

- **Cisteïnes:** la seqüència de l'LPL conté 10 cisteïnes implicades en la formació de pots disulfur: 27 i 40; 216 i 239; 264 i 283; 275 i 278; 418 i 438. Aquests enllaços són vitals per al correcte plegament i funció de l'enzim.
- **Asparagines:** l'LPL és una glicoproteïna, la qual conté entre un 8-12% de glúcids. A la seqüència d'aminoàcids apareixen 3 asparagines (43, 257 i 359) en la seqüència consens Asn-X-Ser/Thr, potencials llocs de glicosilació. Però l'Asp257 té com a segon aminoàcid una prolina, l'únic que no permet l'N-glicosilació de l'asparagina. De les dues glicosilacions restant, la de l'Asp43 és vital per a la secreció de l'LPL i la seva activitat (Ben-Zeev et al., 1994; Kobayashi et al., 1994).

La seqüència d'aminoàcids de l'LPL està fortament conservada entre diferents espècies. Tot i ser resultats obtinguts a partir de l'ADNc i no de la proteïna directament, està descrit que hi ha un percentatge d'homologia entre l'LPL humana i de rata o de macaco del 91 i del 99%, respectivament. L'LPL està descrit que té una taxa de mutació 2-3 vegades inferior a altres proteïnes vasculars i, possiblement per aquest fet, entre 10 espècies diferents de vertebrats (p.e. cavall o peix) l'homologia de les respectives LPL no és menor al 55% en cap cas; mentre que l'homologia entre l'LPL i la HL o la lipasa endotelial és del 41 i 44%, respectivament (Holmes et al., 2011).

J. Augustin (1978) fa un ampli estudi de comparació molecular entre l'LPL i la HL. La conclusió del treball és que tots dos enzims comparteixen grans similituds (seqüència d'aminoàcids, glicosilació i tríada catalítica), però certes diferències (pes molecular, afinitat pel substrat i cofactor Apo C-II).

3. Processament intracel·lular i secreció

Tot i que la localització de l'LPL activa és a la llum endotelial dels vasos sanguinis, la seva síntesi no està associada a les cèl·lules endotelials, en les quals no es detecta ARNm d'LPL (Camps et al., 1990). La síntesi de l'LPL és exclusiva de cèl·lules parenquimàtiques, com per exemple adipòcits. Aquest fet remarca que són les necessitats fisiològiques de les cèl·lules parenquimàtiques les que regulen la síntesi de l'LPL.

Després de la transcripció del gen de l'LPL, l'ARNm resultant és exportat al citoplasma, on s'iniciarà la traducció al reticle endoplasmàtic rugós (RE). El pèptid senyal determina quina és la destinació de la proteïna naixent. L'LPL és una glicoproteïna amb dues N-glicosilacions en humans, la qual és un senyal típic de proteïnes de secreció (Taylor, 2011). L'N-glicosilació de la proteïna s'esdevé en bloc durant la mateixa traducció de l'ARNm.

Si la proteïna naixent no es plega o no es glicosila correctament, abandona més lentament el RE i formarà agregats. Aquests agregats no avancen en la síntesi de la proteïna i seran degradats al lisosoma (Ben-Zeev et al., 1994; Kobayashi et al., 1994; Park et al., 1995). En la maduració de la proteïna i el seu plegament correcte, hi intervenen tant la *Sel-1 suppressor of lin-12-like protein* (Sel1L) i la *lipase maturation factor 1* (LMF1). La LMF1 és una xaperona de lipases i en casos de deficiència de la LMF1, l'LPL naixent forma agregats i es degrada (Doolittle et al., 2010; Peterfy, 2012). La Sel1L permet la secreció de l'LPL des del RE cap al *cis*-Golgi (Sha et al., 2014).

Una vegada ha estat traduït tot l'ARNm i s'han transferit els dos blocs de glicosilació, s'inicia la maduració de l'LPL (Figura 5).

La primera de diverses modificacions de la glicosilació és l'eliminació en el RE de les tres glucoses terminals mitjançant dues glucosidases (I i II) i l'eliminació d'una mannososa mitjançant una α -mannosidasa. A continuació, la proteïna correctament plegada i amb les dues N-glicosilacions parcialment modificades, es mobilitza al complex de Golgi.

Durant el trànsit des del *cis*-Golgi cap al *trans*-Golgi se segueix modificant el conjunt de sucres que formen la glicosilació: tres mannososes són extretes per l'acció de la mannosidasa I i una N-Acetilglucosamina (GlcNAc) és afegida per una transferasa. A continuació, dues mannososes més són extretes per la mannosidasa II. A partir d'aquesta forma, en el *trans*-Golgi, es poden generar diverses estructures per l'acció de diferents transferases, les quals afegixen GlcNAc, galactoses o residus d'àcid siàlic. Aquestes variants de la composició de les cadenes de l'N-glicosilació podrien ser les responsables de l'aparició de part de les isoformes de pl de l'LPL (Casanovas et al., 2009a).

L'activació de l'activitat enzimàtica de l'LPL s'esdevé en el RE. Per una banda, C. Vannier (1989) ja descriu la proteïna activa durant el trànsit pel Golgi. També, en casos de bloqueig del transport d'LPL cap al Golgi, aquesta s'acumula ja activa al RE (Ben-Zeev et al., 1992; Ben-Zeev et al., 2002). L'acció en el RE de les glucosidases I i II, associades a l'eliminació de les glucoses de la glicosilació, és necessària per a la correcta funció de l'enzim (Park et al., 1995).

La dimerització de la proteïna també és un procés indispensable per a l'activació de l'LPL, ja que el monòmer és una forma inestable (Osborne et al., 1985). De forma similar a l'activació de l'enzim, l'eliminació de les glucoses de la glicosilació és vital per a la dimerització de l'LPL (Park et al., 1995).

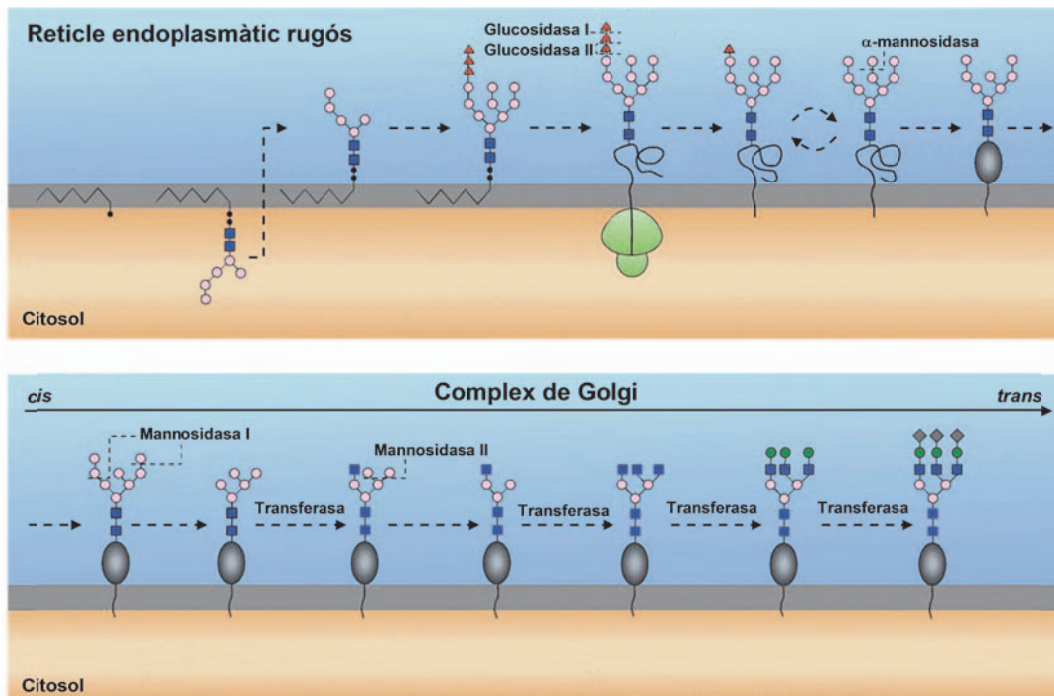


Figura 5. Maduració de l'N-glicosilació de l'LPL en el RE i el complex de Golgi. Durant la síntesi de la proteïna ja s'afegeix la glicosilació al pèptid naixent. A partir d'aquest moment, s'inicia la maduració de la modificació posttraduccional (■, N-acetilglucosamina; ▲, glucosa; ●, mannosa; ◆, àcid siàlic; ●, galactosa). El nombre i tipus de ramificacions és variable (Taylor, 2011). Figura de Casanovas (2009), adaptada de Helenius and Aebi (2001).

Al final del procés de maduració en el Golgi, l'LPL pot seguir tres vies diferents (Figura 6):

- 1) **Degradació** via lisosoma: l'LPL intracel·lular té una taxa de síntesi molt elevada, però una gran part és degradada. En adipòcits en condicions basals, més del 80% de la LPL de nova síntesi serà degradada sense arribar a ser secretada. Tanmateix, aquesta degradació es redueix per efecte de l'heparina (Cupp et al., 1987).
- 2) **Incorporació** a vesícules de secreció: aquesta proteïna serà secretada de forma *regulada* o degradada al lisosoma, segons les condicions fisiològiques de l'animal. Són diversos els estímuls hormonals que regulen la secreció de la LPL (Taula 1).
- 3) **Secreció** a la membrana plasmàtica: model de secreció sense regulació, *secreció constitutiva*. Aquesta secreció és present en tots els teixits que sintetitzen LPL i no es regula pels processos de situació fisiològica del teixit. Tanmateix, es pot regular pretraduccionalment.

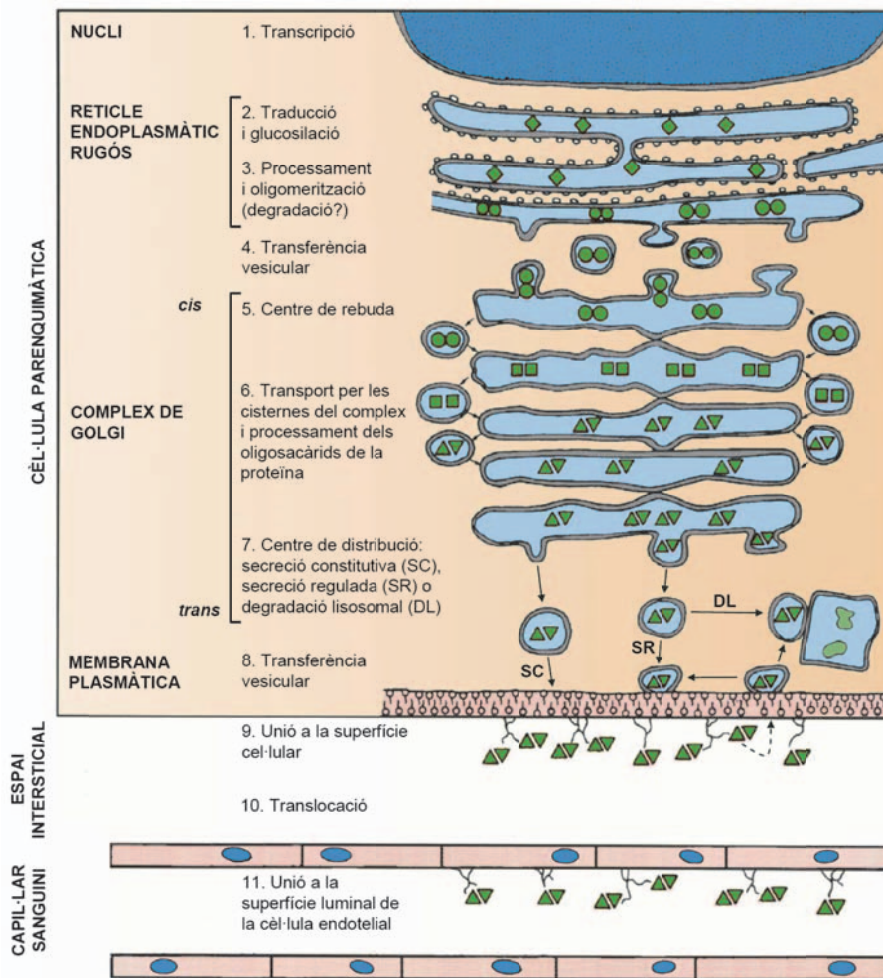


Figura 6. Síntesi i secreció de l'LPL. Transport de l'LPL des de la seva síntesi al reticle endoplasmàtic fins al seu destí, a través del complex de Golgi. Durant el transport, les N-glicosilacions de l'LPL són modificades (figures verdes). La destinació de l'LPL de nova síntesi ve determinada pels requeriments fisiològics de la cèl·lula parenquimàtica: pot ser secretada o degradada al lisosoma (DL). La secreció de l'LPL tan pot ser de forma constitutiva (SC) com regulada (SR). Figura de Casanovas (2009), adaptada de Braun and Severson (1992).

La proteïna finalment secretada se situa als HSPG de la membrana de les cèl·lules parenquimàtiques. En aquesta localització, interactua amb la GPIHBP1 per viatjar fins a la membrana basal de les cèl·lules endotelials (Davies et al., 2010). Finalment, ambdues proteïnes són transportades a la cara luminal dels endotelis (Davies et al., 2012).

Tant en cèl·lules parenquimàtiques com endotelials, l'LPL es pot reincorporar a vesícules. Mentre que en el primer cas, la reinternalització de l'LPL està relacionada en processos de degradació de la proteïna, en les cèl·lules endotelials no s'ha descrit degradació de l'LPL (Davies et al., 2012).

L'LPL situada als HSPG de la llum endotelial té una vida mitjana curta, d'uns 30 minuts. Passat aquest temps, el dímer monomeritza i perd afinitat. El monòmer, el qual presenta baixa afinitat per l'ancoratge, és arrossegat pel torrent sanguini fins al fetge, el qual captarà àvidament la proteïna i la degradarà (Vilaro et al., 1988a).

4. Regulació posttraduccional

La regulació de la síntesi i de l'activitat de l'LPL és un procés molt complex i específic segons diversos factors que condicionen l'activitat LPL. Aquesta regulació és tan important per l'efecte coll d'ampolla (*gate-keeper*) de l'LPL, ja que és el principal enzim encarregat de l'entrada de lípids provinents de QM i VLDL als teixits extra-hepàtics. Aquesta regulació està dissenyada per facilitar la captació de NEFA de TAG segons les necessitats metabòliques de cada teixit.

L'LPL se sintetitza en una gran varietat de teixits, però en més quantitat en teixits com el TAB i teixit adipós marró (TAM), cor, múscul i glàndula mamària (durant la lactància). Altres teixits que presenten menor expressió de l'LPL són en macròfags, glàndules adrenals, cervell, pulmó, ronyó, aorta toràctica, ovari, testicles i melsa (Mead et al., 2002). El fetge no sintetitza LPL, excepte en el nounat (Vilaro et al., 1988b) i en casos de regeneració hepàtica (Sabugal et al., 1996). La regulació de l'LPL s'esdevé tant a nivell transcripcional com traduccional o posttraduccional.

Tanmateix, la regulació de l'activitat LPL és un procés molt especial, ja que per la seva localització funcional extracel·lular és complicat poder-hi aplicar els mecanismes habituals de regulació (p.e. fosforilació o al·lostèria).

En el nostre grup de recerca, hem descrit que la perfusió del TAB amb un donador d'òxid nítric causa l'alliberament de l'LPL cap al torrent sanguini (Ricart-Jane et al., 2008) i que *in vivo* l'LPL pot nitrar-se sota l'efecte de lipopolisacàrids (LPS) (Casanovas et al., 2009b). Així, el nostre grup ha proposat que una modificació posttraduccional com la nitració de l'LPL deguda a la producció d'òxid nítric per la òxid nítric sintasa endotelial podria causar un pèrdua d'afinitat per l'ancoratge o per l'homodímer i alliberar l'LPL cap al torrent sanguini.

4.1. Interacció amb altres proteïnes

L'activitat LPL que es detecta a cada teixit és el resultat de la regulació de l'expressió, la traducció de la proteïna LPL i tot un conjunt de proteïnes accessòries, a més de la pèrdua d'activitat per alliberament de l'LPL des dels HSPG. Aquestes altres proteïnes accessòries col·laboren en la regulació posttraduccional de l'LPL. El seu efecte és present des de la maduració de l'LPL en el RE fins al transport i localització de l'LPL a la llum endotelial. Per tant, l'efecte que puguin tenir aquestes proteïnes accessòries és vital pel resultat final.

4.1.1. LMF1

La *lipase maturation factor 1* (LMF1) se sintetitza a tots els teixits i és necessària per al correcte plegament de la LPL, HL i la lipasa endotelial, però no per a la PL (Figura 7) (Doolittle et al., 2010). Per aquest motiu es pensa que va aparèixer com a mecanisme de regulació de les noves lipases, les quals presenten major similitud.

L'LMF1 és una proteïna de membrana. Situada al RE, entre d'altres estructures, presenta dos dominis de la llum reticular que interaccionen amb les lipases: la nansa C i la regió proximal de l'extrem carboxi-terminal. Els monòmers d'LPL acabats de sintetitzar i plegar, s'uneixen a la nansa C de l'LMF1 (domini

d'unió a lipases). D'aquesta manera, els monòmers d'LPL són més estables, s'evita la inactivació, el plegament incorrecte i la degradació. Una vegada estabilitzats els monòmers, l'LMF1 afavoreix la dimerització de les lipases (Figura 8) (Doolittle et al., 2010).

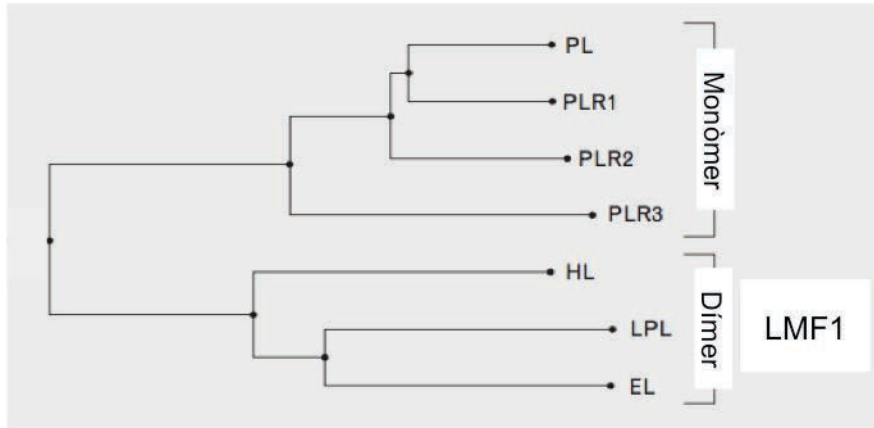


Figura 7. Arbre filogenètic de les lipases. En l'organització de les diferents lipases, es diferencien dos grups, en funció de l'estructura quaternària: lipasa pancreàtica (PL) i lipases relacionades a la PL (PLR1, PLR2 i PLR3) són funcionals com a monòmers, mentre que l'LPL, la lipasa endotelial (EL) i la lipasa hepàtica (HL) han de dimeritzar per ser funcionals. Totes tres lipases que dimeritzen requereixen de la LMF1 com a xaperona. Adaptada de Doolittle et al. (2010).

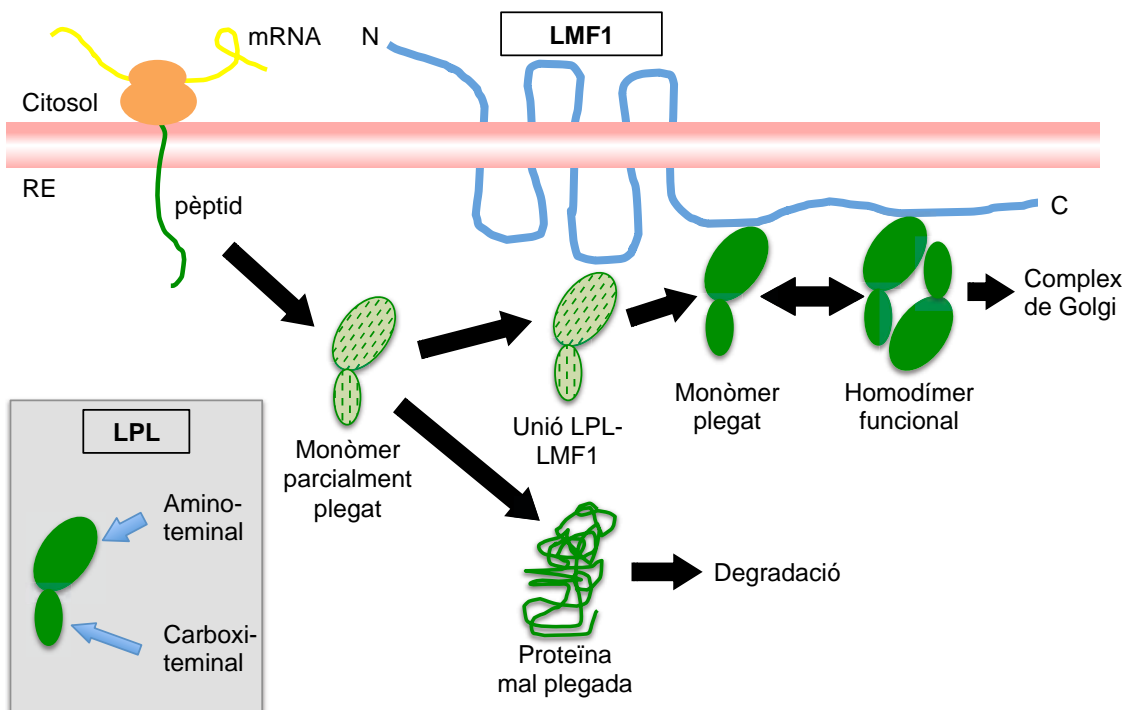


Figura 8. Proposta d'actuació de la LMF1 en l'estabilització i dimerització de l'LPL. L'LPL acabada de sintetitzar és un monòmer parcialment plegat. L'LPL s'uneix a l'LMF1, la qual l'estabilitza i n'afavoreix la dimerització. Aquest homodímer funcional segueix el camí de la secreció cap al complex de Golgi. En cas de no unir-se a la LMF1, probablement l'LPL es plegui de forma incorrecta i es degradi al mateix RE. Adaptada de Doolittle et al. (2010).

L'LMF1 és proposada com a mecanisme de regulació posttraduccional, fent de coll d'ampolla per la síntesi d'LPL: aquella proteïna naixent que no sigui controlada per l'LMF1 formarà agregats i es degradarà al mateix RE (Peterfy, 2012). Així, en casos de deficiència d'LMF1, hi ha una disminució de l'activitat LPL detectada en plasma postheparínic i un augment dels TAG en circulació (QM i VLDL) (Peterfy et al., 2007).

4.1.2. *Sel1L*

La *Sel-1 suppressor of lin-12-like protein* (*Sel1L*) és una proteïna associada a la ruta de degradació de proteïnes del RE. Aquesta proteïna és estrictament necessària per a la secreció de l'LPL, ja que interactua amb LMF1 i el dímer d'LPL. Aquest conjunt de les tres proteïnes, a més de mantenir l'activitat LPL, determina que la proteïna segueixi la via de secreció cap al Golgi. Segons els estudis de H. Sha (2014) en models de ratolí deficients en *Sel1L*, l'LPL s'acumula de forma monomèrica i inactiva en el TAB i augmenta la degradació lisosomal.

4.1.3. *ANGPTL4*

L'*angiopoietin-like 4* (*ANGPTL4*) és una proteïna similar a l'angiopoietina i s'expressa en la majoria de teixits però principalment en el fetge i TAB (Kersten et al., 2009). La regulació de l'LPL a través de l'*ANGPTL4* va ser descrita per K. Yoshida (2002), però ja s'estava acotant des de feia temps que la regulació de l'LPL de TAB causada pel dejuni estava regulada per una tercera proteïna (Bergo et al., 1996b; Bergo et al., 2002; Doolittle et al., 1990). El resultat de l'acció de l'*ANGPTL4* recau en la inactivació de l'LPL, tot i que encara no està descrit si l'acció de l'*ANGPTL4* és sobre l'estabilitat del dímer o sobre l'activitat de l'enzim (Sukonina et al., 2006). Per altra banda, està descrit que la interacció LPL-*ANGPTL4* és per l'extrem amino-terminal de l'LPL (Nilsson et al., 2012). Un altre efecte de l'*ANGPTL4* és l'estímul de la lipòlisi i el seu conseqüent augment de NEFA en plasma (Mandard et al., 2006).

La presència d'*ANGPTL4* en plasma humà està descrita, però no sembla que l'*ANGPTL4* inhibeixi l'LPL de la llum endotelial, ja que les lipoproteïnes que són substrat de l'LPL (i.e. QM i VLDL) eviten la inhibició de l'LPL per part de l'*ANGPTL4* (Nilsson et al., 2012). A més, l'*ANGPTL4* és també present a la matriu extracel·lular, unida als HSPG (Cazes et al., 2006). Per això, és possible que la funció de l'*ANGPTL4* es dugui a terme durant el desplaçament entre la superfície de les cèl·lules parenquimàtiques fins a les cèl·lules endotelials.

L'expressió de l'*ANGPTL4* està fortament regulada, sobretot pels receptors activadors de la proliferació peroxisomal (PPAR): l'isotip PPAR α regula l'expressió en el fetge, mentre que en miòcits humans depèn del PPAR β/δ (Kersten et al., 2009). En TAB, l'expressió de l'*ANGPTL4* està regulada en part pel PPAR γ (Yoshida et al., 2002). Múltiples situacions fisiològiques també poden afectar-ne la seva expressió, com per exemple el dejuni o l'exercici (Kersten et al., 2009).

L'ús de l'*ANGPTL4* com a inhibidor de l'activitat LPL es pot explicar per la diferent velocitat de síntesi d'ARNm de l'LPL i de l'*ANGPTL4*. En un experiment fet

per E. Makoveichuk (2012), es demostra que la síntesi d'ARNm de l'ANGPTL4 és més ràpid que el de l'LPL. Per tant, en cas de necessitat de reducció de l'LPL, és més eficient augmentar la síntesi d'ANGPTL4 i mantenir l'elevada taxa de síntesi d'LPL (per futurs moments de necessitat d'incorporació de NEFA).

4.1.4. GPIHBP1

La *glycosylphosphatidylinositol-anchored HDL binding protein 1* (GPIHBP1) ja l'hem presentada anteriorment com una proteïna acompanyant de l'LPL des de la superfície de les cèl·lules parenquimàtiques fins a la llum endotelial. En l'estructura de la GPIHBP1 són presents una sèrie d'aminoàcids negatius a l'extrem amino-terminal, els quals interaccionen específicament amb els dominis d'unió amb l'heparina de l'LPL (Ioka et al., 2003). Per tant, a diferència de l'LMF1, la GPIHBP1 interactua únicament amb l'LPL i no amb altres lipases.

La síntesi de la GPIHBP1 és pràcticament exclusiva de les cèl·lules endotelials i en presenten una elevada síntesi el cor, el múscul i el TAM (Beigneux et al., 2007; Davies et al., 2008). La GPIHBP1 és present des de la membrana de les cèl·lules parenquimàtiques fins a la llum endotelial, i és la responsable del transport de l'LPL a través de les cèl·lules endotelials (Davies et al., 2010). La unió entre la GPIHBP1 i l'LPL no afavoreix l'activació del dímer, simplement n'estabilitza l'activitat (Sonnenburg et al., 2009). Una vegada a la llum endotelial, es crea una plataforma composta per l'LPL, els HSPG i la GPIHBP1, la qual interactua amb els QM i VLDL circulants (Beigneux et al., 2007; Dallinga-Thie et al., 2010). La GPIHBP1 localitzada a la llum endotelial és capaç de retornar cap a la matriu extracel·lular (Davies et al., 2012). Aquest moviment possiblement sigui per anar a buscar més LPL present a la matriu extracel·lular, ja que la vida mitjana de l'LPL és considerablement més curta que la vida mitjana de la GPIHBP1 (Olafsen et al., 2010). A més, com que és difícil afectar a l'LPL pels mecanismes tradicionals de regulació quan està situada a la llum endotelial, aquest moviment podria ser un mecanisme de regulació posttraduccional. És a dir, la GPIHBP1 podria mobilitzar l'LPL encara activa cap a la matriu extracel·lular i separar-la físicament del seu substrat (QM i VLDL).

Una altra de les funcions de la GPIHBP1 és la protecció contra la inhibició de l'LPL per part de l'ANGPTL4. W. Sonnenburg (2009) va descriure que la incubació d'LPL amb ANGPTL4 en causava la inactivació, però aquest fet no s'esdevenia en presència de GPIHBP1. Aquest efecte protector també es va demostrar *in vivo* en ratolins.

4.1.5. Apolipoproteïnes

Les apolipoproteïnes (Apo), tot i representar un petit percentatge de les lipoproteïnes, són la clau de tots els seus constituents. Les Apo B són presents en totes les lipoproteïnes des del seu moment de síntesi en l'intestí o en el fetge, durant tot el seu cicle metabòlic. Les altres Apo (Apo A, Apo C o Apo E) no estan permanentment unides a lipoproteïnes. Aquestes proteïnes, a més de formar part

de l'estructura de les lipoproteïnes, determinen el futur de les lipoproteïnes: moment i lloc de degradació.

Pel que fa a l'LPL, hi ha diverses Apo relacionades (Julve, 2016):

Apo A-V

És una proteïna de 336 aminoàcids i de síntesi hepàtica. Tot i que la seva concentració en plasma és molt baixa (només el 4% de VLDL duen Apo A-V), la seva presència afavoreix la reducció de TAG en plasma. Tanmateix, en pacients diagnosticats amb diabetis tipus 2, la concentració d'aquesta apolipoproteïna es correlaciona positivament amb la concentració de TAG en plasma (Dallinga-Thie et al., 2006). En una publicació de M. Merkel (2005) es demostra que l'Apo A-V afavoreix la interacció entre lipoproteïnes i l'LPL. Posteriorment, també es va demostrar la unió de l'Apo A-V i la GPIHBP1 (Beigneux et al., 2007). Tanmateix, la deficiència d'Apo A-V es pot compensar per la sobreexpressió d'LPL (Nilsson et al., 2011).

Apo C-I i Apo C-III

Aquestes dues apolipoproteïnes, de 57 i 79 aminoàcids respectivament, també són sintetitzades al fetge. Estan descrites com a inhibidores de l'activitat LPL (Jong et al., 1999). A més, la presència d'Apo C-I o Apo C-III en QM i VLDL poden evitar la interacció entre les lipoproteïnes i l'LPL (Larsson et al., 2013). Aquesta reducció de la unió podria afavorir la inhibició de l'LPL per part de l'ANGPTL4.

Apo C-II

La síntesi d'Apo C-II és al fetge i té un total de 79 aminoàcids. A diferència de les altres Apo C, l'Apo C-II és un activador de l'LPL (Bengtsson and Olivecrona, 1982), tot i que el mecanisme pel qual interactuen no ha estat descrit encara. Una dieta alta en lípids estimula la síntesi d'Apo C-II en fetge (Goldberg et al., 1990).

5. Regulació fisiològica

La regulació de l'activitat de l'LPL és un procés molt complex i important. Tal i com ja ha estat presentat anteriorment, l'LPL juga un paper clau en el repartiment dels TAG provinents de la dieta o del fetge. Per això, segons la situació fisiològica en què es trobi l'individu, la resposta a un cert estímul hormonal pot ser totalment diferent en diferents teixits.

La Taula 1 resumeix l'efecte d'algunes hormones sobre l'activitat enzimàtica de l'LPL en diferents teixits:

Mediador	Teixit	Efectes en LPL
Catecolamines	Cor	↑ activitat
	TAM	↑ARNm, ↑ activitat
	TAB	↓ activitat
Glucocorticoides	Cor	↑ activitat
	TAB	↑ ARNm, ↑ activitat
Insulina	TAB	↑ ARNm, ↑activitat
Prolactina	TAB	↑ activitat

Taula 1. Efecte de diferents hormones sobre l'LPL. Tant l'expressió de l'LPL com la seva activitat estan àmpliament regulats. A més, segons la situació fisiològica, el control de l'LPL és un procés vital.

Per l'impacte que tenen en el consum de TAG i perquè són els teixits amb més expressió d'LPL, ens centrarem en la regulació fisiològica de l'activitat LPL del TAB, TAM i múscul (cor i múscul esquelètic). El fetge, tot i que també juga un paper molt important en el metabolisme dels TAG, no sintetitza LPL de forma habitual.

5.1. Teixit adipós blanc

A cada teixit adipós s'associen diferents propietats i característiques, des de l'ús majoritari que en fan dels NEFA fins a l'expressió de certes hormones. Fins i tot, s'ha descrit l'efecte que té cada tipus de teixit adipós en malalties cardiovasculars o l'aparició de diabetis, ja sigui efecte preventiu o potenciador (Bjorndal et al., 2011). Per tant, el control d'entrada de NEFA (a través de l'LPL) ha d'estar fortament regulat segons els requeriments fisiològics de cada tipus de TAB.

En casos de dejuni estudiats en rata, l'activitat LPL en el TAB pateix una pronunciada disminució per tal d'afavorir la captació d'àcids grassos per part dels altres teixits. El valor mínim de l'activitat LPL es detecta a les 48 hores d'haver iniciat el dejuni (Quig et al., 1983). Aquesta regulació ja s'esdevé a les primeres hores des de l'inici del dejuni (Bergo et al., 1996a, b; Doolittle et al., 1990; Wu et al., 2003) i s'ha proposat que és a nivell posttraduccional (Bergo et al., 2002; Doolittle et al., 1990; Simsolo et al., 1993), ja que durant les primeres etapes, la taxa de síntesi d'ARNm es manté constant.

Amb l'alimentació, i per tant, el final del dejuni, l'activitat LPL del TAB augmenta ràpidament amb enzim de nova síntesi (Parkin et al., 1982). Aquest increment s'associa principalment a la resposta per part del TAB a la insulina, ja que n'augmenta la transcripció, traducció i el transport cap a l'endoteli (Eckel et al., 1984; Semenkovich et al., 1989).

Contràriament a la insulina, les catecolamines causen una reducció de l'activitat LPL en el TAB (Ball et al., 1986). Com a exemple, en el nostre grup d'investigació es va demostrar que l'administració a rates d'un β agonista de l'adrenalina, l'isoproterenol, causa una reducció de l'activitat LPL en TAB (Ballart et al., 2003).

L'estrès és una situació fisiològica que també afecta a l'activitat LPL del TAB. La relació entre l'estrès i la regulació de l'activitat LPL en els diferents teixits ha estat àmpliament estudiada en el nostre grup de recerca. Per exemple, en el treball de D. Ricart-Jané (2005) es va estudiar l'efecte de l'estrès agut i crònic per immobilització en diversos teixits de rata. Mentre que l'estrès agut causa una caiguda en l'activitat LPL del TAB retroperitoneal, l'estrès crònic disminueix l'activitat LPL del TAB epididimal. En tots dos casos, la síntesi d'ARNm es manté constant, la qual cosa dona pes a una regulació posttraduccional.

En una situació d'inflamació, són diversos els factors que afecten l'activitat LPL del TAB. Per exemple, l'administració de lipopolisacàrid farà augmentar els nivells de factors d'inflamació i causarà una reducció de l'activitat LPL del TAB (Casanovas et al., 2009b; Picard et al., 2001). Aquesta regulació s'explica per la producció autocrina de factor de necrosi tumoral α (TNF- α) per part de les cèl·lules parenquimàtiques (Orban et al., 1999). A més, estudis fets pel nostre grup d'investigació van demostrar que un augment en la concentració d'òxid nítric en els vasos sanguinis del TAB epididimal causen l'alliberament de l'LPL cap al torrent sanguini (Ricart-Jane et al., 2008).

5.2. Teixit adipós marró

La regulació fisiològica de l'LPL en el TAM ha estat estudiada a través de catecolamines. Per exemple, C. Carneheim (1984) va administrar noradrenalina *in vivo* en rates, les quals van presentar una elevada activitat LPL en el TAM com a resposta al tractament. També aquesta hormona provoca un augment de l'expressió de l'ARNm de l'LPL en aquest teixit (Trayhurn et al., 1995). Aquests efectes també es detecten en els casos de tractament amb isoproterenol, un β -adrenèrgic.

5.3. Múscul

En els estudis de la regulació fisiològica de l'LPL en múscul, s'inclouen els treballs fets tant en múscul esquelètic com múscul cardíac.

El dejuni en el teixit muscular provoca un augment de l'activitat LPL (Quig et al., 1983; Ruge et al., 2001). De forma oposada, l'alimentació està descrita com un factor que redueix l'activitat LPL en el cor (Doolittle et al., 1990). Aquestes respostes contràries a la resposta descrita en TAB, respon a la necessitat

fisiològica de cada teixit en cada moment. I aquesta resposta diferencial de cada teixit està associada a processos de regulació posttraduccionals.

Les catecolamines causen un augment de l'activitat LPL en múscul esquelètic (Gorski and Stankiewicz-Choroszuca, 1982) i cor (Alousi and Mallow, 1964). En una situació d'augment de l'activitat física, està descrit que en múscul hi ha un augment des de la transcripció fins a l'activitat LPL (Seip et al., 1995). Aquest augment va relacionat amb un increment dels nivells hormonals de catecolamines.

Novament, en una situació d'inflamació per administració de lipopolisacàrid, en múscul s'esdevé un augment de la producció d'òxid nítric i una disminució de l'activitat LPL (Picard et al., 2001). A diferència del TAB, en el cor de rata la producció de TNF- α provoca un augment de l'activitat LPL al teixit (Semb and Olivecrona, 1986). Tanmateix, en un experiment realitzat en el nostre grup de recerca, es va observar que l'administració de lipopolisacàrid en rata provoca una disminució de l'activitat LPL en el cor, però no en el múscul esquelètic (Casanovas et al., 2009b) .

6. Patologies relacionades amb la lipoproteïna lipasa

L'LPL és l'enzim limitant en la degradació de QM i VLDL circulants i la consegüent entrada de NEFA en els teixits perifèrics. És per aquest motiu que un defecte en la funció de l'LPL tindrà greus repercussions en el metabolisme general i la vida de l'animal. Estan descrites més de 100 mutacions en humans que causen dèficit d'activitat LPL en plasma postheparínic. La deficiència d'activitat LPL té una prevalença, en general, d'1:1.000.000 en la població (Nierman et al., 2005).

En ratolins, casos de deficiència d'LPL causen la mort postnatal dels animals. Aquests resultats demostren que l'LPL no és un enzim vital per al desenvolupament embrionari, però que pren més rellevància en iniciar-se l'alimentació oral. Aquest efecte letal en animals deficients d'LPL es va eliminar en expressar l'LPL funcional en TAB, múscul o cor (Levak-Frank et al., 1999; Levak-Frank et al., 1997). En el cas de no expressar LPL en TAB però sí en cor o múscul, els TAB d'aquests animals es mantenen en les mateixes dimensions que els animals que expressaven LPL en TAB (Weinstock et al., 1997). Per tant, els TAG presents en els adipòcits tant poden ser originaris de la reesterificació de NEFA provinents de QM o VLDL (en una situació de no deficiència d'LPL) com de nova síntesi a partir de glucosa (en cas patològic).

La deficiència en activitat LPL es caracteritza per un augment en la concentració de lipoproteïnes (QM i VLDL), descrit com la síndrome de quilomicronèmica. A més, els pacients poden presentar dolor abdominal, pancreatitis, xantomes, hepatomegàlia, esplenomegàlia i lipèmia retinal (Nierman et al., 2005). En individus heterozigots, l'activitat LPL en plasma postheparínic es veu reduïda i presenta una concentració de TAG en plasma lleument augmentat.

El tractament de la deficiència d'activitat LPL té l'objectiu com a evitar l'aparició de la síndrome quilomicronèmica. D'aquesta manera, es pretén reduir el risc de pancreatitis i altres malalties cardiovasculars. Aquest tractament es basa principalment en la dieta, ja que el tractament farmacològic ha resultat tenir molt poc impacte en la concentració lipídica. Per altra banda, la dificultat de seguir règims estrictes i el poc seguiment que presenten, són un estímul per al desenvolupament de teràpies gèniques. La teràpia gènica es basa en diversos motius per donar-hi suport (Nierman et al., 2005), per exemple:

- El diagnòstic de la deficiència de l'LPL pot ser molt acurat i, per tant, es pot determinar quin és exactament el defecte.
- Existeixen models animals amb LPL deficient per avaluar la viabilitat de les diferents teràpies.
- El gen de l'LPL és petit, així és fàcilment incorporable en diversos vectors. A més, s'expressa en múscul, que és un teixit diana molt accessible.
- La majoria de pacients presenten LPL inactiva en plasma. Per tant, es redueix el risc de resposta immunitària a l'LPL transgènica.

6.1. Hipertrigliceridèmia

L'efecte directe de la disminució de l'activitat de l'LPL o defecte funcional de l'LPL es veu reflectit en la concentració de TAG en plasma. Estan descrites més de 100 mutacions relacionades amb la deficiència de l'activitat LPL (Nierman et al., 2005). El plasma resultant d'aquestes persones és des d'aspecte tèrbol a lletós, fins i tot en plasma en dejuni. La deficiència en l'activitat LPL està associada amb un major risc de malalties cardiovasculars (Han et al., 2016).

6.2. Síndrome metabòlica

La síndrome metabòlica rau en un desajust en el balanç metabòlic i és un factor predictiu de malaltia cardiovascular i diabetis (Grundy, 2016). Diversos estudis han correlacionat l'LPL (activitat LPL en plasma postheparínic o massa d'LPL o catàlisi de VLDL,...) amb la probabilitat de desenvolupar síndrome metabòlica.

En la determinació de la situació fisiològica, un determinant clau és la relació entre l'activitat LPL en múscul i en TAB (Zechner et al., 2000). Segons la relació d'aquestes dues activitats, es pot determinar si predomina una situació d'emmagatzematge (elevada activitat en TAB respecte el múscul) o de consum de TAG (reduïda activitat LPL en TAB respecte múscul). Per tant, un desequilibri en l'activitat LPL d'aquests dos teixits, pot causar l'acumulació de TAG en el TAB i afavorir l'aparició de la síndrome metabòlica.

6.3. Aterosclerosi

L'aterosclerosi és una de les causes de diverses malalties cardiovasculars. Es pot considerar com una forma crònica d'inflamació agreujada per l'acumulació de lípids. L'LPL es creu que juga un paper molt important en l'acumulació de lípids en macròfags i la progressió de les plaques arterioscleròtiques. L'expressió de l'LPL en macròfags s'ha descrit com a factor per al desenvolupament d'aterosclerosi (Kobayashi and Mabuchi, 2015).

L'acció enzimàtica de l'LPL genera NEFA i LDL. Els NEFA seran reesterificats pels macròfags i les LDL seran oxidades i també incorporades als macròfags. Tots dos factors afavoriran la transformació a cèl·lules escumoses. A més, l'LPL actua com a lligant entre lipoproteïnes i receptors de l'endoteli (Nykjaer et al., 1994). També l'LPL està descrita com a promotor de la unió de monòcits a l'endoteli vascular. Alguns estudis correlacionen positivament el valor d'activitat i la massa d'LPL en plasma postheparínic amb el desenvolupament de la malaltia en pacients amb hipercolesterolèmia familiar.

Per altra banda, també s'han escrit estudis en què pacients amb deficiència total d'LPL o expressió reduïda (ja sigui activitat o proteïna total) presenten processos avançats d'aterosclerosi. Contràriament, mutacions que comporten un augment de l'activitat d'LPL van tenir un efecte protector contra el desenvolupament de malalties coronàries (Sagoo et al., 2008).

Per tant, les evidències descrites en diferents estudis no són concloents (Olivecrona and Olivecrona, 2010). Són necessaris més estudis de seguiment de cohorts per a l'estudi de la implicació de l'LPL en l'aparició d'aterosclerosi.

6.4. Malaltia d'Alzheimer

Diversos estudis han demostrat que la prevalença de la malaltia d'Alzheimer és menor en individus que prenen estatines (inhibidors de la HMG-CoA reductasa) per a la reducció de colesterol. Aquest efecte es va relacionar amb el fet que les estatines regulen també la concentració en TAG a través de l'activitat LPL (Schoonjans et al., 1999). És possible que les estatines estimulin l'LPL present a certes regions cerebrals. Del treball de Baum (2000), es desprenen dues conclusions: la primera és que variacions en la seqüència d'aminoàcids de l'LPL tenen un important efecte en característiques associades al desenvolupament de la malaltia (p.e. menor plaques amiloides i més neurones). A més, l'LPL afavoreix la captació d'elements de membrana o antioxidants a través de la captació de lipoproteïnes (implicació de l'Apo E i de la proteïna relacionada amb el receptor d'LDL -LRP-).

Isoformes de punt isoelectric

1. Modificacions posttraduccionals i isoformes

Les modificacions posttraduccionals (PTM) són modificacions covalents en la seqüència primària d'aminoàcids de qualsevol proteïna. Actualment estan descrites més de 450 PTM, de les quals més de 100 s'han descrit en humans. Les PTM més freqüents són la fosforilació, ubiquïtinació, acetilació o glicosilació (Pagel et al., 2015) (Taula 2).

Mentre que la quantitat de proteïna està limitada pels processos de traducció, transcripció i degradació de la proteïna, l'activitat, localització i funció d'aquestes proteïnes es regula, principalment, per la seva estructura. És en aquest punt on intervenen les PTM, ja que poden regular de forma ràpida la resposta de les proteïnes a estímuls interns o externs.

Modificació posttraduccionals	Variació de pes (Da)	Funcions destacades
Fosforilació (Ser, Tyr, Thr)	+80	Activació/inactivació enzimàtica, senyalització, modulació d'interacció molecular
Acetilació	+42	Estabilitat de la proteïna, regulació de la interacció amb el DNA.
Metilació	+14	Regulació de l'expressió de gens
Acilació	Variable (+204, +210,...)	Localització cel·lular, mediador d'interacció entre proteïnes
Ubiquïtinació	>1.000	Senyal de degradació
Glicosilació (Asn, Ser, Thr, Tyr)	Variable (203, >800)	Proteïnes de secreció, funcions de regulació

Taula 2. Modificacions posttraduccionals més importants i comunes. Per a cada modificació, està descrita la variació del pes molecular que implica (Da) i les principals funcions amb què es relaciona. Adaptada de Mann (2003).

Com a conseqüència de les PTM, poden coexistir en un mateix moment múltiples variants d'una mateixa proteïna, les quals es poden diferenciar per una PTM o la combinació de diverses PTM.

El terme per definir les variants d'una mateixa proteïna ha estat àmpliament debatut. Alguns dels noms utilitzats són, per exemple, variants de proteïna, isoformes, proteoformes, formes o espècies de proteïna. Tot i que la IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) disposa del terme

isoenzim, la seva definició únicament inclou variants en l'estructura primària d'origen genètic (Rodríguez-Piñeiro et al., 2007; Schluter et al., 2009). En aquest mateix sentit, la IUBMB (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) també descriu el terme isoenzim (i per extensió les isoformes) com les variacions causades per modificacions en l'estructura primària de la seqüència d'aminoàcids (Jungblut et al., 2008). En el treball de J. D. Tipton (2011), tot i que també descriu les recomanacions de la IUPAC, reconeix que a nivell més col·loquial, s'utilitza el terme "isoformes" o "variants" per definir la població d'espècies d'una proteïna generada des de nivell genètic fins a nivell posttraduccional. Encara al 2013, L. M. Smith (2013) va tornar a plantejar la nomenclatura utilitzada fins aleshores i els problemes que pot originar no tenir ben definit aquest concepte

Tot i aquesta problemàtica, en l'article de G. Marko-Varga (2004), de la IUPAC, ja es descriu que es pot identificar una mateixa proteïna en un elevat nombre d'isoformes per diferents estats de fosforilació. A més, el terme isoforma és àmpliament utilitzat: té més de 150.000 cites en articles. Per tot això, en aquest treball s'ha aplicat el terme isoforma a les variants descrites en l'LPL.

Existeixen moltes proteïnes de les quals se n'ha descrit la presència d'isoformes. En general, les isoformes poden ser de pes molecular (quan es diferencien pel MW de les isoformes) o de punt isoelèctric (quan es diferencien pel pI de la proteïna). Gran part d'aquest avenç ha estat possible per la posada al punt de l'enfocament en dues dimensions (pH i MW) amb la posterior digestió i identificació de les proteïnes per espectrometria de masses. Més recentment, l'anàlisi directa de les mostres d'interès amb eines proteòmiques (cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses) ha permès identificar milers de PTM.

1.1. El cas de l'LPL

L'LPL ha estat molt poc estudiada des d'un abordatge de les característiques. El valor del punt isoelèctric de l'LPL ha estat publicat amb elevada diversitat de valors (Augustin et al., 1978; Sato et al., 1997; Soteriou and Cryer, 1993). Tot i la diversitat de resultats experimentals obtinguts en els valors del pI de l'LPL, en el nostre grup d'investigació s'ha descrit per primera vegada l'existència d'isoformes de pI de l'LPL tant en cor i plasma postheparínic de rata (Casanovas et al., 2009a) com en plasma postheparínic humà (Badia-Villanueva et al., 2014). En totes dues espècies, l'LPL està formada per un mínim de 7 isoformes de diferent pI i de mateix MW aparent, que es distribueixen en un interval de pH de 6,5 a 8,5 aproximadament (Figura 9).

Per a l'LPL, un únic gen genera un sol ARNm sense procés de maduració alternativa i, per tant, les modificacions han de ser a nivell posttraduccional. A més, aquestes isoformes són de pI, ja que únicament són descrites quan se separen en un gradient de pH.

De l'LPL, se sap que part de les isoformes de pI són causades per la glicosilació de la proteïna i que la fosforilació no hi juga cap paper (Casanovas et al., 2009a). Tanmateix, no s'ha pogut descriure quines són les causes que generen tota la població d'isoformes de pI de l'LPL. Respecte les conseqüències, fins a data

d'avui no s'han determinat les implicacions d'una població d'isoformes de pI d'aquest enzim.



Figura 9 Isoformes de pI de l'LPL de cor de rata. Imatge obtinguda a partir de l'enfocament en dues dimensions (punt isoelèctric i pes molecular) de l'LPL purificada a partir de cor de rata. Adaptada de Casanovas et al. (2009a).

1.2. Altres proteïnes

Una PTM que pot generar isoformes de pI d'una proteïna, molt habitual i molt caracteritzada és la fosforilació. Un exemple és el treball de V. Zabrouskov (2008), en què es detalla la fosforilació de la troponina cardíaca. Sovint, aquesta PTM va associada a un procés de regulació. A més, aquesta modificació es planteja com una biomarcador, ja que correlaciona positivament amb la insuficiència cardíaca crònica (Peng Y, 2014). Altres treballs descriuen la variació d'isoformes de la troponina en diverses situacions fisiològiques, però són isoformes originades per maduració alternativa o canvi d'expressió en gens (Marston and Redwood, 2003) i per tant, són isoformes de MW i no únicament de pI.

Un altre cas és, per exemple, l'estudi de la glicosilació en la proteïna C9 del complement humà (Franc et al., 2017). En aquest cas, van ser capaços de descriure 15 variats de la proteïna degudes a les PTM en glicosilacions. Aquestes isoformes no són degudes a la presència o absència de la PTM, sinó a la complexitat en la ramificació de les glicosilacions. A diferència de l'exemple en la fosforilació, V. Franc i els seus col·laboradors (2017) no van ser capaços de determinar funcions específiques per a cada isoforma.

Un paradigma de proteïna amb PTM són les histones (Arnaudo and Garcia, 2013; Lin et al., 2014). Aquestes proteïnes, relacionades íntimament amb la cromatina i en processos de regulació de l'expressió genètica, tenen descrites isoformes degudes a fosforilació, metilació, acetilació, etc. A més, cada PTM està relacionada amb una funció sobre la histona. En un treball de H. Nishida (2015) es descriuen 4 isoformes, segons el seu pI i es comparen les distribucions en diferents classes de fongs. Val a dir que el valor de pI de les isoformes és teòric i, com l'LPL, poden existir diferències entre els valors teòrics i els valors descrits experimentalment.

Una altra proteïna molt estudiada actualment pel que fa a variants moleculars és la PTEN (*Phosphatase and tension homolog deleted on chromosome 10*) (Malaney et al., 2017). Aquesta proteïna està implicada en diversos punts de funcions cel·lulars relacionats en la senyalització de processos oncogènics i també està relacionada amb malalties neurològiques. Si ens centrem únicament en les PTM, la PTEN en té descrites diverses, les quals determinen processos com l'activitat catalítica, la localització o les interaccions entre proteïnes. Per exemple, la fosforilació o ubiquïtinació de la proteïna inhibeix la dimerització de l'enzim. A més, està descrit que la presència de certes PTM permeten la modificació per altres PTM de la proteïna. Per exemple, la metilació de la Lys313 afavoreix la fosforilació de la regió C-terminal. Així, les PTM tenen un gran impacte en les funcions de la PTEN i l'expandeixen en possibles variants.

L'estudi de les isoformes en altres proteïnes, com ara l'albumina, té elevat interès perquè estan relacionades amb l'efecte de certs fàrmacs (Gil et al., 2017) o la reacció al·lèrgica que poden generar les diferents variants de la proteïna en llavors de plantes (Korte et al., 2017). En aquest segon estudi, han arribat a generar un patró d'abundància de cada isoforma de l'albumina en els diferents cultius estudiats. Malauradament, aquestes variants són de MW, generades mitjançant 3 procediments:

- 1) Origen de diferents gens.
- 2) Maduració alternativa de l'ARNm.
- 3) Trencament de la seqüència d'aminoàcids de la proteïna per punts variables.

Enfocat des d'un punt de vista diferent, el múscul esquelètic ha estat estudiat des de la perspectiva de la presència d'isoformes. Així, amb l'objectiu de comparar diferents patrons d'expressió de variants de proteïnes en diferents situacions, S. Murphy (2016), mitjançant l'anàlisi de mostres per espectrometria de masses, ha aconseguit identificar més de 1.000 isoformes. Però aquesta metodologia no permet diferenciar l'origen de les isoformes de pl i, per tant, no es poden diferenciar les originades per PTM de la resta.

Tal i com es desprèn de la bibliografia citada fins ara, és rar que en estudis de caracterització d'isoformes es tingui en compte un fil argumental longitudinal, amb un abordament dels estudis des de la presència i distribució de les isoformes fins a la caracterització de les modificacions posttraduccional que les poden originar. Dit d'una altra manera, és més freqüent articles que descriguin la presència (i amb sort la variació d'isoformes) mitjançant la quantificació de les imatges obtingudes però que no estudiïn l'origen molecular d'aquestes isoformes ni les implicacions funcionals que tenen.

D'altra banda, actualment, amb la millora de les eines proteòmiques, han aparegut un gran nombre d'estudis en què es caracteritzen les modificacions posttraduccional presents en el conjunt d'isoformes d'una proteïna, però que no s'estudia el patró d'isoformes ni es du a terme un pre-fraccionament de les possibles isoformes a fi de descriure-les independentment les unes de les altres.

II. OBJECTIUS GENERALS



En el nostre grup de recerca, vam descriure per primera vegada que la lipoproteïna lipasa (LPL) és un conjunt de variants de la proteïna del mateix pes molecular aparent però de diferent punt isoelèctric (pI). En aquesta Tesi Doctoral, pretenem continuar l'estudi de les isoformes de pI de l'LPL, aprofundint en 3 aspectes fonamentals:

I. La **distribució de les isoformes de pI de l'LPL.**

Amb el descobriment de les isoformes de pI de l'LPL ja vam descriure diferències en les isoformes obtingudes entre el plasma postheparínic i el cor de rata. Ara, pretenem estudiar la possible existència d'isoformes de l'LPL en diferents teixits de rata i, si n'hi ha, comparar-ne la distribució.

A més, també pretenem estudiar la possible presència d'isoformes de pI de l'LPL en una altra espècie de mamífer: el macaco de Java. Aquesta espècie és més propera als humans i, per tant, els resultats obtinguts en l'LPL tindran major rellevància clínica.

II. La **funció de les isoformes de pI de l'LPL.**

Fins al descobriment de les seves isoformes, l'LPL s'havia considerat una sola proteïna. Per tant, tots els estudis fets respecte a la seva fisiologia i la seva funció s'han de replantejar per tal d'incloure aquesta nova característica: l'LPL és un conjunt d'isoformes de pI.

A més, pretenem estudiar la regulació posttraduccional de la funció de l'LPL, ja que és possible que les isoformes siguin un producte de la seva regulació fisiològica. Per això és necessari reproduir situacions fisiològiques en rata, en les quals anteriors autors hagin proposat una regulació posttraduccional de l'LPL.

III. L'origen** de les isoformes de pI de l'LPL.**

A partir dels antecedents del nostre grup, sabem que les isoformes de l'LPL són degudes en part a la glicosilació de la proteïna. Tanmateix, encara han d'existir altres modificacions posttraduccional que generin certa heterogeneïtat d'isoformes.

En general, l'origen molecular de les isoformes pot ser molt ampli, ja que estan descrites més de 300 modificacions posttraduccional que poden afectar múltiples aspectes de les proteïnes.

Per tant, nosaltres pretenem estudiar les modificacions posttraduccional, i també la seqüència d'aminoàcids, que podrien originar les diferents isoformes de l'LPL.

Aquesta Tesi pretén abordar l'estudi de les isoformes de pI de l'LPL des de diferents característiques que afecten la proteïna. Per entendre les implicacions de les diferents característiques moleculars en el conjunt de l'estudi, es farà un abordament dels objectius per a l'estudi de les característiques de l'LPL molt longitudinal, ja que ens plantegem estudiar des de la presència i distribució de les

isoformes, les seves característiques funcionals, fins a les modificacions posttraduccional que les poden originar.

Per això, el fet de plantejar un estudi complet i enfocat des de diferents perspectives sobre les isoformes de pI de l'LPL és un valor afegit a les conclusions que se n'extreguin dels resultats. Aquesta perspectiva d'estudi pot servir com a model per al descobriment d'altres proteïnes amb isoformes des d'un enfocament multidisciplinar i coherent.

III. RESULTATS I DISCUSSIÓ



Distribució de les isoformes de pl de l'LPL

1. Antecedents

A partir del descobriment de les isoformes de pl de l'LPL (Casanovas et al., 2009a) en cor i plasma postheparínic de rata, ens vam plantejar quines implicacions podia tenir aquesta característica molecular entre els diferents teixits. Fins al moment, en altres proteïnes diferents a l'LPL, la presència o absència d'isoformes s'ha fet servir com a marcador per comparar diferents processos (Bouley et al., 2004; Natale et al., 2010; Rodríguez-Piñeiro et al., 2007; Roudeau et al., 2015). Però la descripció de les isoformes de la mateixa proteïna en diferents teixits no s'ha contemplat en cap cas. En el cas de l'LPL, la seva activitat en cada teixit és regulada de forma diferencial: per exemple, en una mateixa condició fisiològica, l'activitat LPL del TAB i del cor poden variar de forma diferent.

Un primer fet que destaca la importància de les isoformes i el seu origen posttraduccional és que la seva existència no pot ser deguda a l'expressió de diferents gens ni a la maduració alternativa de l'ARNm, ja que només un gen codifica l'LPL i no està descrit cap procés de maduració alternativa de l'ARNm. Malgrat aquesta afirmació, fins aquest moment, la detecció i identificació de les isoformes de l'LPL en rata s'ha fet sempre a partir d'una purificació parcial de la proteïna, la qual incloïa un elevat nombre d'individus per tal de poder tenir prou quantitat de mostra (Casanovas et al., 2009a). Per tant, no s'ha pogut confirmar experimentalment la presència d'isoformes en un sol individu.

Un altre suport al fet de l'origen posttraduccional de les isoformes és que el nostre grup de recerca ha demostrat que part de l'heterogeneïtat de les isoformes de pl de l'LPL és deguda a la glicosilació de la seqüència d'aminoàcids (Casanovas et al., 2009a), ja que el tractament amb una deglicosidasa redueix el nombre d'isoformes. Aquest fet potencia la idea que les isoformes són degudes, almenys en part, a modificacions posttraduccional (PTM) i no a processos de transcripció ni traducció dels teixits on s'expressa l'LPL. Per tant, en qüestionem si és possible que el conjunt d'isoformes dels diferents teixits no sigui sempre el mateix i si podria ser que el conjunt d'isoformes variés entre teixits.

Per altra banda, tal i com hem presentat a la introducció general, el fetge de rata adulta és un dels pocs teixits que no sintetitza LPL (Peinado-Onsurbe et al., 1992), sinó que l'activitat LPL que presenta és deguda a l'LPL captada àvidament del torrent sanguini, provinent d'altres teixits (Vilaro et al., 1988a). Tanmateix, un seguit de situacions fisiològiques poden causar que l'LPL sigui sintetitzada en aquest teixit. Un exemple és en l'hepatectomia parcial: durant la regeneració del teixit, hi ha un augment de l'activitat LPL. Aquesta resposta pot ser conseqüència d'un augment de l'ARNm de l'LPL en els hepatòcits (Sabugal et al., 1996) amb

l'objectiu d'aconseguir més NEFA continguts en QM i VLDL, substrat bàsic per a la regeneració tissular.

Un altre cas en què l'activitat LPL del fetge és per síntesi del propi teixit és durant el desenvolupament postnatal de les cries de rata (Reina et al., 1987). En aquesta situació, el fetge també desenvolupa la funció de TAB perquè el nou-nat, en néixer, no té format ni diferenciat el TAB; i no és fins a les 6 hores després del naixement en què l'activitat LPL del teixit adipós s'incrementa significativament (Pequignot-Planche et al., 1977). Aquest increment de l'activitat LPL en TAB es manté fins als 50 dies de vida (Hietanen and Greenwood, 1977). En paral·lel al desenvolupament del TAB al nou-nat, l'activitat LPL en el fetge es manté durant tot el període d'al·letament, encara que a mesura que el TAB es desenvolupa, l'activitat LPL del fetge es va reduint. A partir del deslletament, l'activitat en fetge és pràcticament nul·la. Altres teixits de cria de rata, com per exemple cor, TAM o pulmons, també presenten expressió i activitat LPL (Galan et al., 1993). Per aquests teixits, els valors d'activitat també augmenten ràpidament des del moment del naixement.

Per a l'estudi de l'LPL, anteriorment ja s'havia intentat el procés d'immunoprecipitació (IP) amb diferents anticossos: P66 i GB1 (Casanovas, 2009). El P66 és un anticòs policlonal obtingut en gallina contra LPL bovina (Casanovas et al., 2008); el GB1 és també un anticòs policlonal obtingut en gallina, però contra un pèptid sintètic de l'LPL. L'objectiu d'aquest procés d'immunoprecipitació va ser augmentar la concentració relativa d'LPL en mostres no purificades (p.e. plasma, homogeneïtzats de teixits) i eliminar altres proteïnes majoritàries per aconseguir immunodetectar l'LPL present en les mostres. Aquesta immunoprecipitació es va plantejar abans de la posada al punt de la purificació parcial per heparina-*Sepharose*.

L'experiència no va ser positiva, ja que en l'el·luït no es va detectar l'LPL, però sí que ho feia en el rentat de la columna. Pels resultats obtinguts aleshores, semblava que els experiments no van funcionar per problemes en el reconeixement de la proteïna per part de l'anticòs durant el procés d'IP.

Tanmateix, com que es va poder aconseguir un mètode alternatiu (cromatografia d'afinitat en heparina-*Sepharose*), es va decidir no seguir treballant amb la IP. Actualment la IP de l'LPL es planteja com una eina complementària a la purificació parcial que permetria en primera instància reduir la complexitat de les mostres i, indirectament, treballar en processos de co-immunoprecipitació com a eina molt interessant per a l'estudi d'interaccions entre proteïnes: GPIHBP1, apolipoproteïnes, SelL1, etc.

L'estudi de l'LPL habitualment l'hem desenvolupat en models cel·lulars i animals (rata o ratolí, principalment). Les característiques d'aquests dos models (requeriments d'espai, equips, instal·lacions,..) permeten el treball de forma rutinària i completa: estudis d'adaptació (Kersten et al., 2009), mutacions dirigides (Levak-Frank et al., 1999), etc. Tanmateix, durant el desenvolupament d'aquest treball, ens va sorgir la possibilitat de treballar amb mostres de macaco de Java (*Macaca fascicularis*). Aquesta espècie ha estat anteriorment utilitzada per a l'estudi del metabolisme lipídic (Goldberg et al., 1988), però mai s'ha descrit l'activitat LPL

en els diferents teixits ni en diferents situacions fisiològiques. A partir d'aquesta oportunitat, vam tenir a la nostra disposició mostres de diferents teixits per a l'estudi de l'LPL en aquesta espècie: determinar l'activitat LPL en els teixits i descriure la presència d'isoformes de pl de l'LPL.

2. Objectius específics

Tot i que l'LPL ha estat àmpliament estudiada (expressió, funció, regulació,...) fins a dia d'avui no s'havia plantejat la descripció de la distribució de les isoformes de pl entre els diferents teixits de rata.

Per altra banda, el fet d'estudiar per primera vegada l'LPL en macaco de Java, ens permet obtenir informació rellevant en relació a les característiques de l'LPL humana.

Per tot això, ens plantegem estudiar la presència d'isoformes de pl de l'LPL en diferents teixits animals, com el cor, TAB o TAM, en dos models experimentals, rata i macaco:

- En primer lloc, volem determinar en rata si un mateix individu presenta totes les isoformes. Per tant, ens plantegem descriure l'existència d'isoformes en teixit d'un únic individu.
- A continuació, novament en mostres procedents d'un nombre elevat d'individus, volem comparar la distribució d'isoformes de pl de teixits adiposos i musculars en dues edats diferents (rata adulta i cria alletant de 15 dies de vida).
- En macaco, pretenem descriure si aquesta espècie presenta isoformes de pl de l'LPL. Per poder-ho fer, haurem d'adaptar els protocols de purificació parcial i identificació de l'LPL que apliquem a teixits de rata.
- Caldrà desenvolupar una metodologia estadística que permeti comparar els resultats obtinguts en la descripció de les isoformes de pl de l'LPL de cada teixit.

3. Plantejament experimental per a l'estudi de la distribució

3.1. Models d'experimentació

En aquest estudi vam treballar amb dos tipus d'animals d'experimentació. Per una banda la rata, que ens va permetre l'estudi de l'LPL en diferents teixits i en diferents edats dels animals. Per l'altra banda, vam tenir la oportunitat d'obtenir teixits de macaco de Java per aprofundir l'estudi de l'LPL fins ara poc estudiada en aquesta espècie.

3.1.1. Rata

Tots els procediments experimentals amb rata van ser duts a terme prèvia aprovació dels models experimentals per part del Comitè Ètic d'Experimentació Animal (CEEA) de la UB i del Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural de la Generalitat de Catalunya (procediment amb número d'ordre DAAM 6666 i 6429).

Distribució de l'LPL en teixits de rata adulta

El primer dels models experimentals va ser dut a terme en rata adulta mascle, en els teixits següents: cor, TAB epididimal, TAM, fetge i múscul esquelètic (extret de la pota posterior). Per assolir aquest objectiu, els animals que vam utilitzar van ser mascles de la soca Wistar, adults i de 225-250 g de pes en el moment d'arribada (Harlan Laboratories Models, Sant Feliu de Codines, Barcelona).

Fins a l'inici dels experiments, els animals van ser estabulats a la sala d'animals del Departament de Bioquímica i Biomedicina Molecular de la Facultat de Biologia de la UB, la qual depèn de la Unitat d'Experimentació Animal de la Facultat de Biologia. Les condicions d'estabulació van ser a una temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ i humitat del $50\pm 5\%$, amb un cicle de llum/fosc de 12h/12h començant a les 8 am i amb menjar (ref. A04, Panlab) i beure *ad libitum*. Els animals es van mantenir en les condicions d'estabulació descrites fins al dia del sacrifici.

Distribució de l'LPL en teixits de cria de rata

Per a la descripció de la distribució de l'LPL, també vam sacrificar cries de rata (mascles i femelles) de 15 dies de vida. En aquest model, per l'edat dels animals, el TAB encara no està desenvolupat (Pequignot-Planche et al., 1977) i per tant, no en podem descriure el patró d'isoformes de l'LPL. Tanmateix, és una de les poques situacions en què el fetge té activitat lipasa d'LPL de síntesi pròpia (Llobera et al., 1979; Vilaro et al., 1988a, b) i no només de HL.

L'interès per l'LPL sintetitzada pel fetge en aquesta edat ens delimitava l'edat de sacrifici dels animals. Per una banda, la necessitat d'aconseguir com més pes de teixit millor, ens demanava allargar al màxim l'edat de les cries (Galan et al., 1993). Per l'altra banda, la pèrdua d'activitat enzimàtica –per reducció de la transcripció i traducció de l'LPL en fetge– durant el desenvolupament postnatal de les cries (Galan et al., 1993) ens obligava a no deixar passar massa temps des del dia del naixement.

A fi de poder treballar amb animals de tan curta edat, vam començar l'experiment des de la gestació amb vint femelles Wistar (Harlan Laboratories Models, Sant Feliu de Codines, Barcelona). Just després del part, en número de nounats per mare es va ajustar a 10. Aquesta part del treball es va desenvolupar a l'estabulari de la Unitat d'Experimentació Animal de la Facultat de Biologia, en les mateixes condicions d'estabulació que a la sala d'animals del departament de Bioquímica i Biomedicina Molecular: temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ i humitat del $50\pm 5\%$, amb un cicle de llum/fosc de 12h/12h començant a les 8 am i amb menjar (ref. A04, Panlab) i beure *ad libitum*. Les cries van restar amb la seva mare en les condicions d'estabulació anteriorment esmentades fins al dia del sacrifici, als 15 dies de vida.

Obtenció de les mostres

Els animals van ser sacrificats per decapitació i ràpidament vam extraure, com a mínim, els teixits d'interès segons cada objectiu. Els teixits extrets es van congelar immediatament en nitrogen líquid per evitar la pèrdua d'activitat enzimàtica. Posteriorment, es van mantenir congelats a -80°C fins al moment d'ús.

3.1.2. Macaco de Java

També conegut com a macaco menja-crancs o cynomolgus, el macaco de Java (*Macaca fascicularis*) és un primat de la família del cercopitecs, originari del sud-est asiàtic. Per la seva fisiologia molt propera a la humana, aquesta espècie de primats ha estat molt utilitzada en experimentació animal. En el nostre cas, hem tingut l'oportunitat de treballar-hi arran de la col·laboració amb l'empresa de fabricació de reactius per al diagnòstic clínic, BioSystems S.A., que utilitza diversos teixits d'aquest animal com a substrat per a malalties autoimmunitàries.

El procediment d'extracció de teixits de macaco està degudament contemplat per l'estudi número S43652 de Harlan Laboratories i el comerç dels animals és regulat pel CITES (the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora).

Distribució de l'LPL en teixits de macaco

L'objectiu de les mostres de macaco va ser més descriptiu, ja que faltava molta informació sobre l'LPL d'aquesta espècie, a diferència de la rata, que ja havia estat descrita anteriorment.

La cura i la manipulació dels animals fou realitzada pel personal de Harlan Interfauna (Sant Feliu de Codines, Barcelona). Les condicions d'estabulació van ser de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ i d'humitat relativa del 40-70%, amb un cicle de llum/fosc de 12h/12h. L'alimentació dels animals era a base de pinso (Teklad 2056NC de Harlan Laboratories Models) i aigua *ad libitum*, més una peça de fruita al dia. Els animals van residir a les gàbies en grups de 3-5 animals.

Obtenció de les mostres

L'extracció de teixits es va fer per part del personal de BioSystems, al mateix centre de Harlan Interfauna on els animals van estar estabulats. Els animals dels quals en vam obtenir les mostres, tant podien ser mascles com femelles.

L'animal era dut ja anestesiats pel personal de les instal·lacions i immediatament es va sacrificar per dessagnat mitjançant una punció intracardíaca. Tot seguit, es va procedir a l'extracció de teixits. Es van prendre mostres de: cor, diafragma, fetge, múscul esquelètic (isquiotibial), diversos TAB (perigonadal, retroperitoneal, mesentèric i visceral), TAM inter-escapular i una mostra de sang.

Si hi havia prou quantitat de teixit, vam separar dues petites mostres de cada teixit, a fi de valorar-ne l'activitat LPL. Ja que el diafragma va ser el primer teixit que va quedar a l'abast durant l'extracció de teixits, vam poder tenir una mostra del temps inicial i del final del sacrifici. Per això, vam prendre una tercera mostra de diafragma (a més de les dues inicials) al final de l'extracció de teixits per avaluar la possible pèrdua d'activitat enzimàtica durant tot el procés d'extracció de teixits: des de la mort de l'animal fins a la congelació de la darrera mostra.

Tant els teixits sencers, com les mostres van ser ràpidament congelades en nitrogen líquid, transportades fins al Departament de Bioquímica i Biomedicina Molecular de la Facultat de Biologia en neu carbònica i emmagatzemades a -80°C fins al moment de fer-ne ús.

4. Patró d'isoformes de pI de l'LPL en teixits de rata adulta

4.1. Demostració d'isoformes per modificacions posttraduccional

A fi de demostrar experimentalment si les isoformes d'LPL són presents en la purificació parcial d'un sol individu i poder determinar si les isoformes són degudes o no a nivell de transcripció de la proteïna, al·lels o PTM, vam purificar l'LPL del cor d'un sol animal (Figura 10).

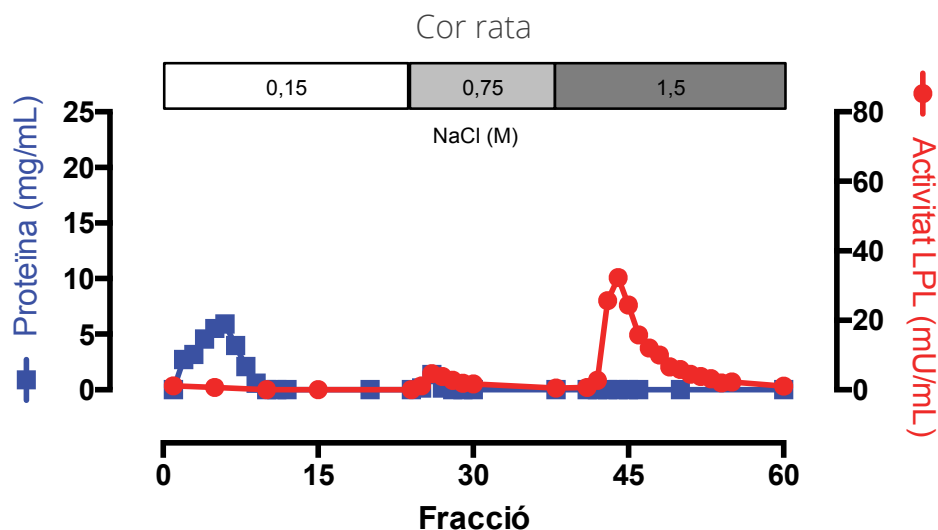


Figura 10. Purificació parcial de l'LPL per cromatografia d'afinitat d'un únic cor de rata adulta. De cada fracció escollida, se'n va quantificar la proteïna total (quadrats blaus) i l'activitat LPL (cercles vermells) en diferents moments d'un gradient creixent de NaCl (eix superior, en gris).

La purificació parcial de l'LPL d'un sol cor va acumular un elevat pic d'activitat LPL en l'elutit (1,5 M NaCl). En aquesta purificació, vam decidir prendre les 5 fraccions amb més activitat enzimàtica en l'elutit (1,5 M NaCl) i destinar tot el volum obtingut a un sol assaig en 2DE-WB (Figura 11).

La imatge obtinguda de l'enfocament de l'LPL d'un sol cor de rata va resoldre el dubte de l'origen de les isoformes, ja que l'LPL obtinguda en aquestes condicions ja va presentar fins a 9 isoformes de pI (Figura 11). Aquest resultat descarta la possibilitat que les isoformes siguin generades a partir d'un conjunt d'al·lels de l'LPL procedent d'un nombre elevat d'individus (Casanovas et al., 2009a). Si aquesta hipòtesi fos certa, en un sol individu no podrien coexistir més de dues isoformes (una per a cada al·lel).

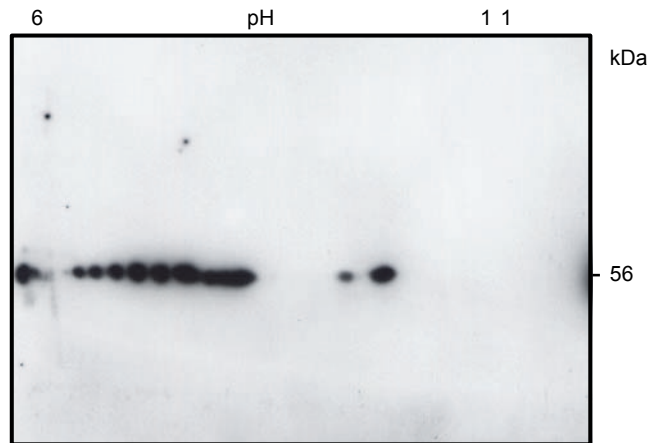
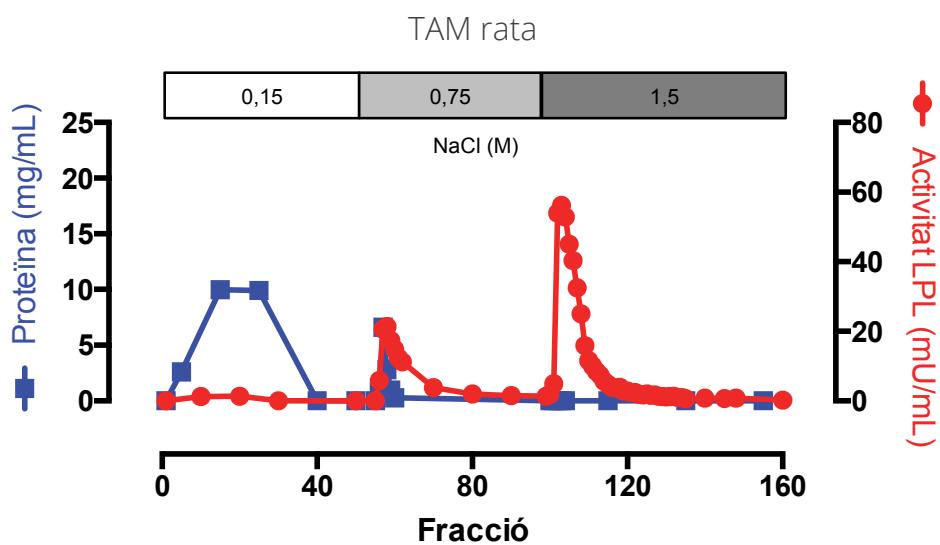
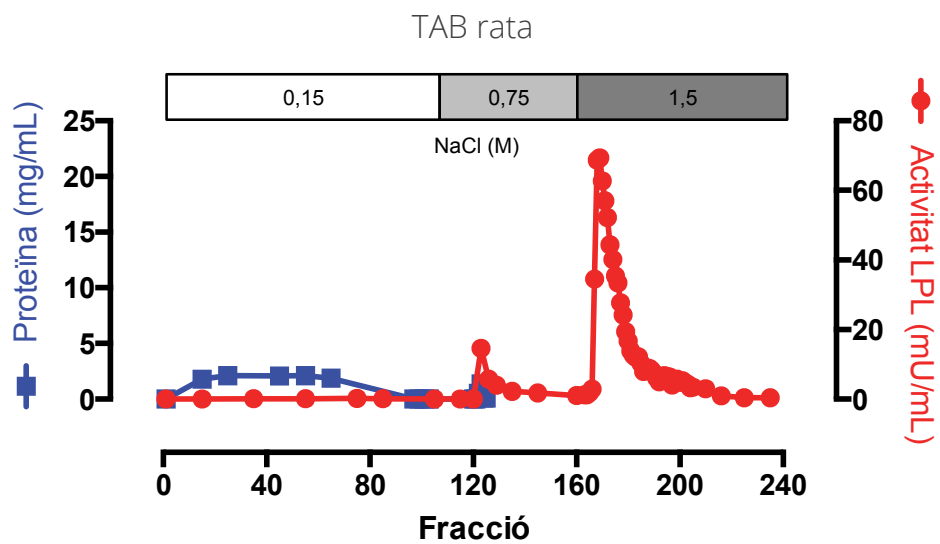
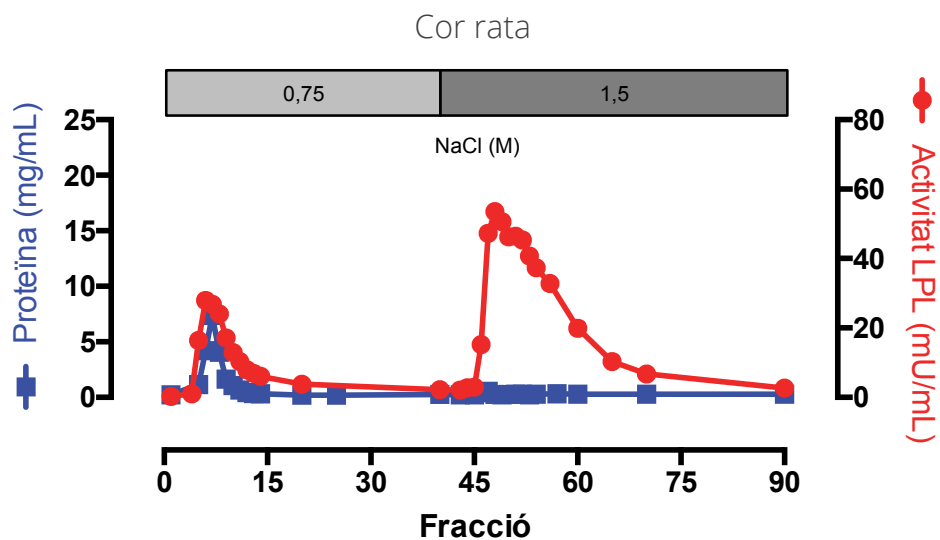


Figura 11. 2DE de l'LPL d'un únic cor de rata adulta. Mostra de cor de rata adulta (n=1) enfocada en una tira d'IEF de pH6-11 en 7 cm i resolta per Western blot (WB) contra LPL. kDa assenyalava el pes molecular de l'LPL (56 kDa).

Tot i haver demostrat que en un sol individu ja es pot detectar la presència d'isoformes, també era necessari acumular tanta quantitat de proteïna com fos necessari per poder desenvolupar rèpliques d'una mateixa mostra i poder fer estudis més complets (p.e. fer l'anàlisi de la mostra en 1DE, quantificació de proteïna, etc.). A més, la presència de les isoformes d'LPL en un sol individu no assegura que, entre diferents rates, no existeixin petites diferències d'expressió de cada isoforma de l'LPL. Per tot això, les diverses purificacions parcials que es van fer dels teixits van incloure un nombre divers d'individus, entre 10 i 30.

4.2. Purificació parcial de l'LPL de teixits de rata adulta

A partir dels teixits obtinguts – cor, TAB, TAM, múscul i fetge- d'animals adults, vam procedir a la purificació parcial de l'LPL per cromatografia d'afinitat (Figura 12). De totes les purificacions parcials, vam quantificar la proteïna i valorar l'activitat LPL de les fraccions.



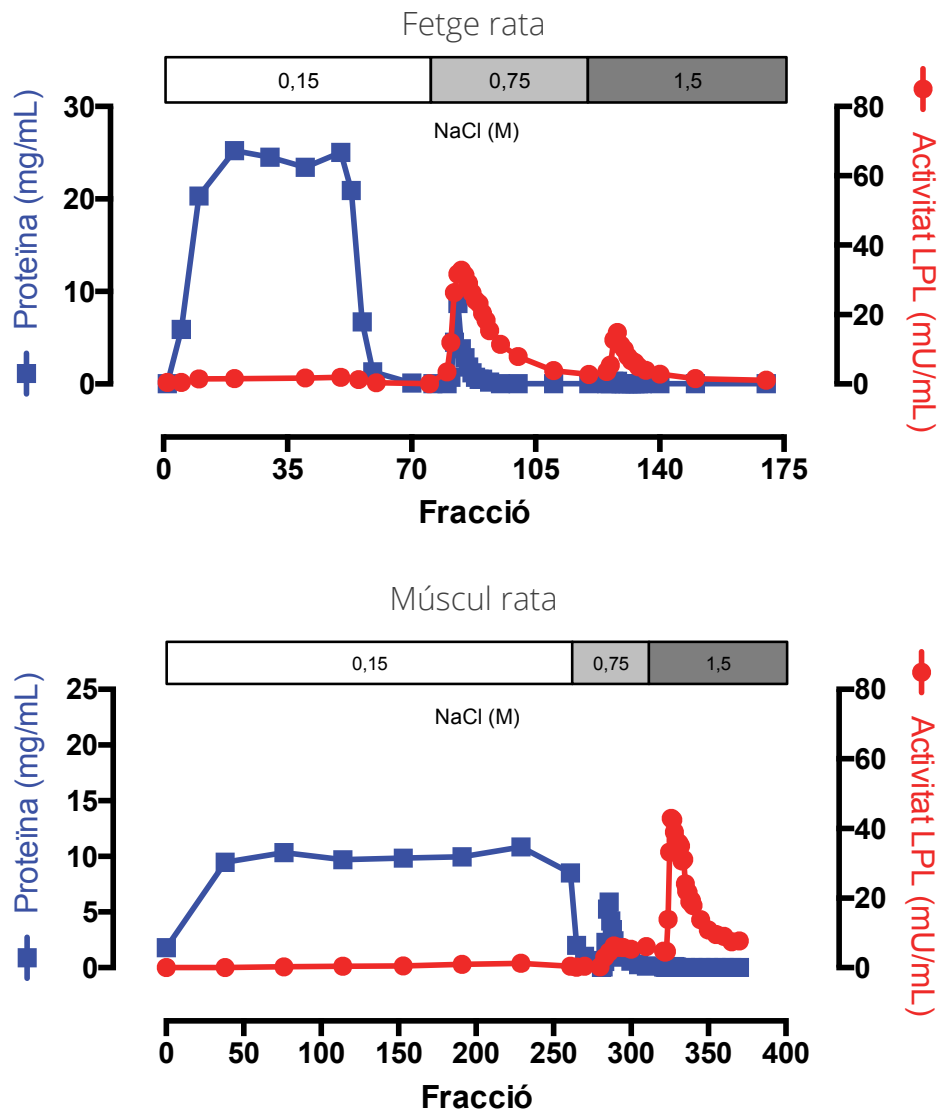


Figura 12. Purificació parcial de l'LPL per cromatografia d'afinitat de diferents teixits de rata adulta. A cada fracció escollida, vam quantificar la proteïna total (quadrats blaus) i l'activitat LPL (cercles vermells) en diferents moments d'un gradient creixent de NaCl (eix superior, en gris). Teixits procedents de 30 animals.

En el cas de la purificació parcial de l'LPL de cor de rata adulta, no vam descriure el pas de la mostra (NaCl 0,15M), ja que ja està descrita la purificació parcial de l'LPL de cor de rata en aquest treball (Figura 10) i en publicacions anteriors (Casanovas et al., 2009a). A més, aquest pas no ens aporta informació sobre l'LPL ni com treballar *a posteriori*.

De cada purificació parcial, vam generar la seva **reserva d'LPL**. Aquesta reserva es defineix com la barreja de les fraccions amb més quantitat d'LPL activa (major activitat enzimàtica) i es va fer servir com a reserva de cada purificació parcial d'LPL per homogeneïtzar els diferents resultats obtinguts en cada assaig. Com a criteri general, a partir d'aquest moment vam decidir que formarien part d'aquesta reserva les fraccions que complissin les següents característiques:

- a) proteïna total no detectable (concentració inferior a 60 µg/mL).
- b) activitat enzimàtica superior a 10 mU/mL.

Aquest criteri de creació de reserva també el vam seguir en l'anàlisi de l'LPL d'un únic cor de rata adulta (Figura 10).

El primer ús d'aquesta reserva va ser per avaluar l'enriquiment de l'LPL des de l'homogeneïtzat fins a l'eluit de cada teixit. Per fer-ho, vam descriure mitjançant electroforesi en SDS-PAGE els diferents moment de la purificació parcial de l'LPL.

A més, també vam analitzar les fraccions just anteriors al pic d'activitat LPL. Aquest volum inicial d'elució, que vam anomenar "prepic", incloïa fraccions amb valors d'activitat LPL superiors a les 10 mU/mL però s'hi podia detectar proteïna. El volum d'aquest prepic era molt reduït (entre una i dues fraccions, menys de 4 mL) i el fet de detectar-hi proteïna total, podia reduir l'enriquiment de l'LPL. Per això, els estudis relatius a les isoformes de l'LPL es van fer a partir de la reserva de l'LPL sense incloure el prepic.

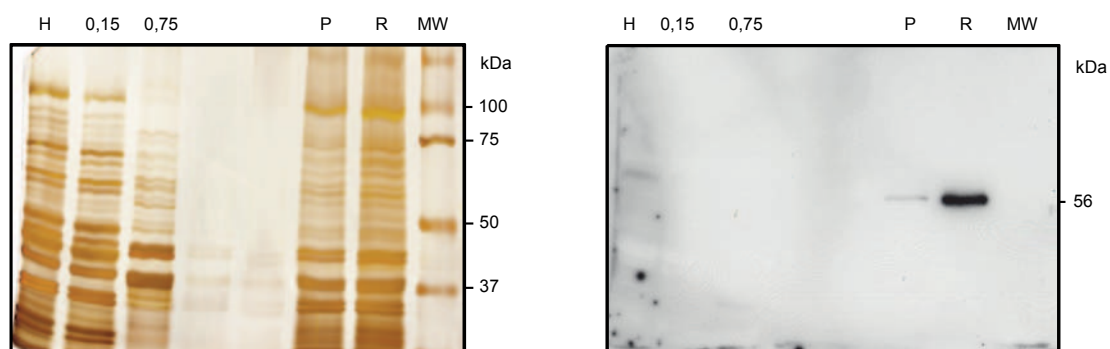


Figura 13. 1DE de la purificació parcial de l'LPL de múscul de rata adulta. Imatges obtingudes mitjançant Ag (imatge de l'esquerra) o WB contra LPL (imatge de la dreta). Les fraccions estudiades representen els diferents passos de la cromatografia: l'homogeneïtzat (H) del teixit, el pas de la mostra per la columna (0,15 M), el rentat de la columna (0,75 M), el prepic de l'elució (P) i la reserva obtinguda en l'elució (R). Per carril, vam carregar 10 µg pel Ag i 100 µg pel WB de proteïna total. MW/kDa és el marcador de pes molecular aparent i el 56 assenyalava el pes molecular de l'LPL.

Les fraccions seleccionades en l'enriquiment els vam resoldre de dues maneres: per tint amb plata (Ag) i per immunodetecció de l'LPL (WB). La Figura 13 exemplifica, en múscul, l'avaluació que vam fer per a cada teixit, mentre que la Figura 14 és un resum del resultat del carril de la reserva per Ag i WB per cada teixit.

Els resultats obtinguts per WB de l'enriquiment de l'LPL de múscul (Figura 13) demostren que el procés va funcionar correctament, ja que vam passar de no immunodetectar l'LPL de l'homogeneïtzat (H) a aconseguir-ho en l'eluit (R). També és important destacar l'aparició discreta de l'LPL des de les primeres fraccions del tampó d'elució, el prepic (P).

Pel que fa als resultats per Ag, cal destacar la variació del patró de bandes segons el punt de la purificació parcial analitzat: certs pesos moleculars abundants en l'homogeneïtzat (H) desapareixen durant el procés i altres prenen major

rellevància. També vam detectar com el pas de la mostra (0,15 M) té un patró de bandes molt similar a l'homogeneïtzat (H). Això indica que la gran majoria de proteïnes d'un homogeneïtzat de teixit tenen molt baixa afinitat per l'heparina, per la qual cosa no queden retingudes per la columna de purificació parcial.

Les diferents purificacions parcials de l'LPL dels teixits amb què vam treballar van servir per aconseguir detectar l'LPL de cadascun dels teixits, excepte el cas del fetge d'adult (Figura 14).

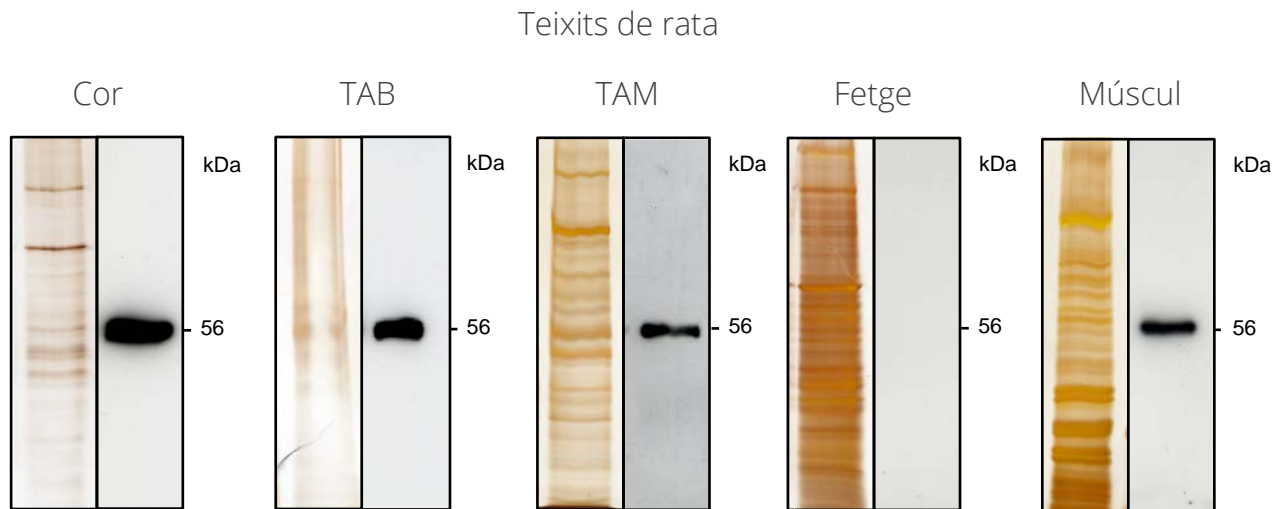


Figura 14. 1DE de la reserva de l'LPL de diferents teixits de rata adulta. Les imatges van ser obtingudes per Ag (esquerra) o per WB contra LPL (dreta) de l'elut de la reserva. En tots els casos, es va fer l'anàlisi de la purificació parcial tal i com es descriu a la **Figura 13**. kDa assenyalava el pes molecular aparent de l'LPL (56 kDa).

Si ens centrem primer en la immunodetecció amb 5D2, anticòs específic contra l'LPL dels **teixits extra-hepàtics** (Chang et al., 1998), veiem que en el cor, TAB, TAM i múscul apareix una única banda que es correspon al pes molecular aparent de l'LPL. Tal i com està descrit (Casanovas et al., 2009a), la cromatografia d'afinitat amb heparina-*Sepharose* ens va servir per enriquir la mostra i, així, poder-ne detectar l'LPL.

En la Ag de les reserves d'LPL dels teixits extra-hepàtics, es veu com no només l'LPL va ser purificada parcialment per la cromatografia d'afinitat: altres bandes de major i menor pes molecular que l'LPL van aparèixer en tots els casos. Això ens indica que en tots els teixits hi ha proteïnes, a més de l'LPL, que tenen alta afinitat per l'heparina. En cada purificació, el procés d'enriquiment i la complexitat proteica de la reserva va ser diferent degut a les diferències intrínseques entre els teixits (i.e. diferències en l'expressió d'aquestes proteïnes amb alta afinitat per l'heparina). Aquestes divergències entre les diferents purificacions es van detectar comparant el nombre de bandes presents i el seu gruix en el tint amb plata.

Pel que fa al **fetge**, el resultat de la purificació parcial de l'LPL d'aquest teixit va assolir uns valors molt petits d'activitat LPL a les fraccions de l'elut (1,5 M NaCl): el valor més alt va ser de 14 mU/mL, mentre que en altres teixits, el pic d'activitat arriba a més de 40 mU/mL (Figura 12). També cal tenir en compte que el valor

d'activitat LPL de l'homogeneïtzat de fetge que vam passar per la columna d'afinitat va ser de 10 mU/mL, mentre que el de cor va ser de 134 mU/mL. Tanmateix, el volum de mostra que es va utilitzar en cada purificació va intentar compensar aquesta diferència d'activitat específica: vam treballar amb 92 mL d'homogeneïtzat de fetge, mentre que de cor van ser 37 mL. El resultat de la diferència del pic d'activitat LPL en la columna de purificació parcial és coherent amb el fet que no va aparèixer cap banda en el resultat per WB contra LPL en avaluar la presència d'aquesta proteïna en la reserva de fetge. A més, la imatge obtinguda de la reserva d'LPL del fetge tenyida amb plata també destaca pel gran nombre de bandes i el seu gruix, a més de la banda d'LPL.

4.3. Anàlisi per 2DE de l'LPL de teixits de rata adulta

Tant bon punt vam descriure els teixits dels quals se n'havia pogut purificar parcialment l'LPL, vam continuar la descripció de les isoformes en aquests teixits. Per tant, a partir d'aquest punt, vam deixar de treballar amb el fetge de rata adulta.

Els objectius van ser la descripció de les isoformes de pl d'LPL mitjançant la tècnica de la 2DE i la descripció del patró de distribució de cada teixit. Per això, vam treballar amb les diferents reserves generades a cada purificació parcial de l'LPL.

La principal conclusió de l'enfocament en 2DE de les reserves de cada teixit és que tant cor, múscul, TAB com TAM presenten isoformes de pl d'LPL (Figura 15). Aquestes isoformes només són detectables després de la purificació parcial dels homogeneïtzats dels respectius teixits.

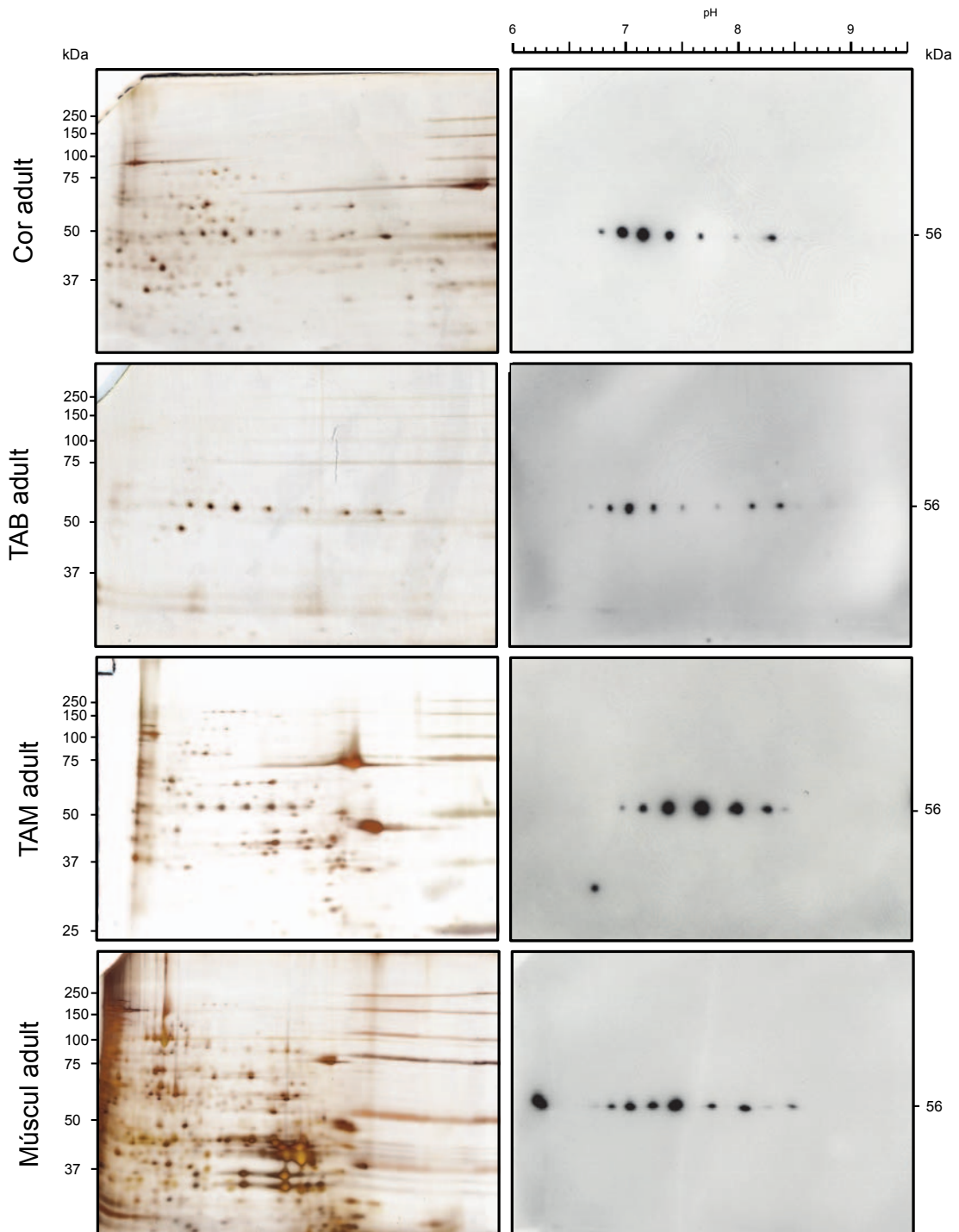


Figura 15. 2DE de l'LPL de diferents teixits de rata adulta. Reserves enfocades en tires d'IEF de pH 6-11 en 11 cm i resoltes per tint de plata (esquerra) o WB contra LPL (dreta). Es van carregar fins a 300 µg de proteïna total per assaig. Es va mantenir la traçabilitat del pH (escala superior a la imatge del WB) tal i com es descriu en l'apartat de materials i mètodes (4.1. Creació del patró d'isoformes de pI de l'LPL). kDa és el marcador de pes molecular aparent i el 56 assenyalava el pes molecular aparent de l'LPL.

Pel que fa als resultats obtinguts per 2DE-WB, primerament cal destacar la netedat de les imatges i l'alta especificitat de l'anticòs 5D2 a l'hora de detectar únicament LPL. També, la metodologia emprada té una molt bona resolució i sensibilitat

(Casanovas et al., 2008), la qual cosa permet detectar petites quantitats d'LPL i diferenciar-ne perfectament cada isoforma. En conjunt, vam descriure entre 7 i 9 isoformes en un interval de pH des de 6,5 fins a 8,5.

De la mateixa manera, els resultats obtinguts en 2DE-Ag de cada teixit demostren el correcte funcionament de la metodologia i l'elevada exactitud en la resolució de l'enfocament de proteïnes mitjançant l'IEF. A més, les imatges obtingudes són coherents amb els resultats ja vistos en els assajos fets en 1DE-Ag per a cada columna (Figura 14): els teixits que presenten més complexitat proteica en la reserva de l'LPL purificada parcialment, també mostren major nombre de proteïnes (major nombre de taques al gel) en l'assaig 2DE. Tanmateix, en cor, TAB, TAM i, en menor mesura, en múscul, les taques corresponents a les isoformes de l'LPL són fàcilment localitzables en els gels tenyits amb plata.

4.4. Patró d'isoformes de pI de l'LPL en rata adulta

Tot seguit, vam processar els resultats obtinguts en els diferents 2DE-WB tal i com s'explica a l'apartat de materials i mètodes 4.1. Creació del patró d'isoformes de pI de l'LPL. Els resultats del processament d'aquesta informació (pI de les isoformes i la seva abundància relativa) van permetre fer una descripció del **patró d'isoformes** de pI de l'LPL dels diferents teixits de rata (Figura 16).

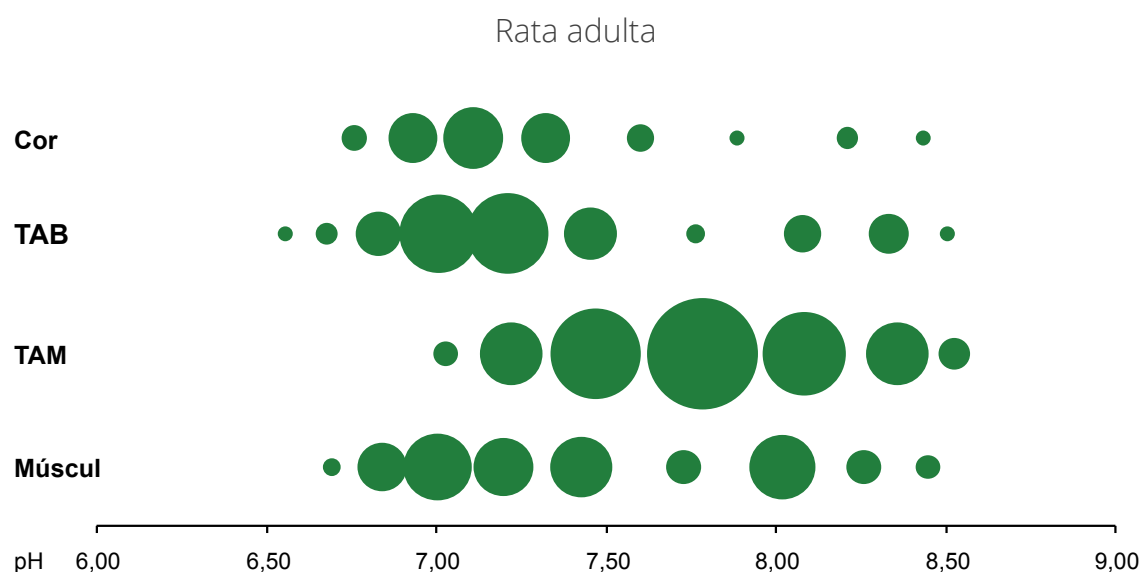


Figura 16. Patró d'isoformes de pI de l'LPL de teixits de rata adulta. Representació de les isoformes segons les mitjanes del seu pI (eix horitzontal) i de la seva abundància relativa (àrea de cada taca). Resultats obtinguts a partir de diverses exposicions de cada WB en 2DE (n=2-4).

A la Figura 16, cada isoforma de l'LPL ve determinada pel seu punt isoelèctric (eix horitzontal) i pel seu percentatge d'abundància relativa (àrea del cercle respecte el total de la superfície de les esferes d'un mateix teixit). Així, el pI de qualsevol isoforma es pot comparar amb el de qualsevol altra, d'entre tots els teixits. Malauradament, en aquesta representació, les abundàncies relatives només

poden comparar-se entre isoformes del mateix teixit. Aquesta diferència entre el pI i l'abundància relativa és deguda al sistema de descripció del patró.

Pel que fa als resultats de l'LPL de **cor**, va presentar un mínim de 9 isoformes de pI de l'LPL, distribuïdes en un interval de pH des de 6,60 fins a 8,43. La major abundància relativa d'aquestes isoformes va estar desplaçada cap al valor de pH més proper a 7: les dues isoformes de l'LPL de pI al voltant d'aquest valor van acumular el 58% de l'abundància relativa.

En el **múscul** també vam detectar i descriure fins a 9 isoformes de pI de l'LPL. Tot i compartir el mateix nombre d'isoformes que el cor, en aquest teixit la distribució va ser més homogènia al llarg de l'interval de pH en què són presents (entre pH 6,70 i 8,45), ja que mentre que al cor només 3 de les 9 isoformes tenien un valor d'abundància relativa superior al 10%, en el múscul van ser 5 isoformes que tenien un valor superior al 10% d'abundància relativa.

En el **TAB**, tot i tenir un nombre total d'isoformes d'LPL detectades superior als dos anteriors teixits (10 isoformes respecte les 9 de cor o múscul), la distribució d'aquestes isoformes va ser molt similar als anteriors casos: interval de presència des de pH 6,56 fins a 8,51 i també és al voltant del pH 7 on hi va haver una major acumulació d'isoformes d'LPL. Les tres isoformes de pI proper al pH fisiològic en aquest teixit, representen el 68% de l'abundància relativa. I, igual que en el cor, la distribució dels percentatges entre les diferents isoformes va ser molt desequilibrada, ja que només en 3 dels 10 casos van assolir un valor superior al 10% d'abundància relativa.

Finalment, vam descriure les 7 isoformes de l'LPL del **TAM** de rata. Aquest va ser el patró que més va divergir dels altres. Per començar, va presentar menys isoformes que els altres teixits; a més, el seu interval de distribució va resultar molt diferent als altres, ja que es comprèn entre valors de pH entre 7,03 i 8,53. Aparentment, sembla que el TAM no genera les isoformes més àcides presents en tots els altres teixits amb els quals vam treballar. I, finalment, les isoformes més abundants van ser al voltant del pH 7,8 aproximadament.

En resum, vam poder descriure el patró de distribució de l'LPL dels quatre teixits dels quals vam purificar parcialment l'LPL: cor, múscul, TAB i TAM. El conjunt d'isoformes de l'LPL de rata, segons aquests resultats, es distribueixen en un interval de pH des de 6,56 fins a 8,53 i el nombre d'isoformes detectades varia entre les 7 i 10, segons el teixit.

Segons on s'acumula la major part de l'abundància relativa de les isoformes de pI de cada teixit, s'identifiquen dues tendències: una primera que inclou el cor, el TAB i el múscul, que pivoten al voltant de pH 7; mentre que la segona tendència és exclusiva del TAM, amb un pic d'abundància relativa al voltant de pH 7,8.

4.4.1. Comparació dels patrons entre teixits

Els patrons d'isoformes de l'LPL de cada teixit es van poder utilitzar com a eina per tal de comparar els diferents teixits. Més enllà de certes característiques fàcilment comparables (nombre d'isoformes, interval de distribució,..), va ser de gran interès poder determinar estadísticament si diferents teixits compartien les mateixes

isoformes i si variaven les seves abundàncies relatives. Tota aquesta comparació dels pI i de les abundàncies relatives va ser desenvolupada amb el càlcul de tots dos paràmetres. Vam dissenyar expressament la metodologia per assolir aquest objectiu, tal i com s'explica a l'apartat de materials i mètodes "4.2.1. Estudi i comparació dels pI de diferents patrons".

Primer de tot, a partir dels valors de pI de tots els replicats aconseguits, vam analitzar l'**homoscedasticitat de variàncies** i la **normalitat de residus** de tots els teixits.

L'homoscedasticitat de variàncies explica la diferència de la dispersió de les observacions respecte la seva mitjana. En el nostre cas, descriu la dispersió de valors de pI entre les diferents isoformes de pI. L'homoscedasticitat assegura que el càlcul de la variància i altres paràmetres sigui correcte i també valida la significació de les anàlisis fetes. En cas de mancar es diu que hi ha heteroscedasticitat de variàncies. Els resultats obtinguts per a cor, TAB, TAM i múscul de rata adulta van ser que tots els teixits presenten homoscedasticitat de variàncies.

Per altra banda, la normalitat de residus descriu la distribució dels residus respecte la seva mitjana. La normalitat de residus assegura l'estimació de les variàncies i els intervals de confiança. Els resultats de la normalitat de residus va ser correcte per a tots els teixits excepte per al TAM, el qual no presenta normalitat de residus (p-value = 0.003506). Davant d'aquest resultat, ens vam plantejar la possibilitat de canviar l'anàlisi a un sistema no paramètric. Tanmateix, al ser un estudi prospectiu i amb un nombre no prou elevat de replicats, vam decidir mantenir el mateix tipus d'anàlisi per a tots els teixits, TAM inclòs, i ser coherents amb els resultats que n'obtinguéssim de l'anàlisi.

Estudi del pI

La Figura 17 mostra de forma esquemàtica l'interval de distribució de cada isoforma, per a cada teixit estudiat. A partir d'aquests resultats es pot veure com la metodologia de quantificació dels pI –des de la col·locació de la tira d'IEF a l'inici de l'SDS-PAGE fins a la determinació del pI- és correcta per treballar, ja que l'amplitud dels intervals de distribució és menor a 0,13 unitats de pH. Aquest interval significa que una determinada isoforma d'un determinat teixit, en qualsevol assaig que es faci, tindrà un pI situat en l'interval de pH aconseguit, amb un 95% de probabilitat. I, per tant, quan dues isoformes de dos teixits diferents solapen els seus intervals, considerem que són la mateixa isoforma i això significa que la mateixa combinació de PTM en una seqüència d'aminoàcids o diferents combinacions de PTM li atorguen el mateix pI.

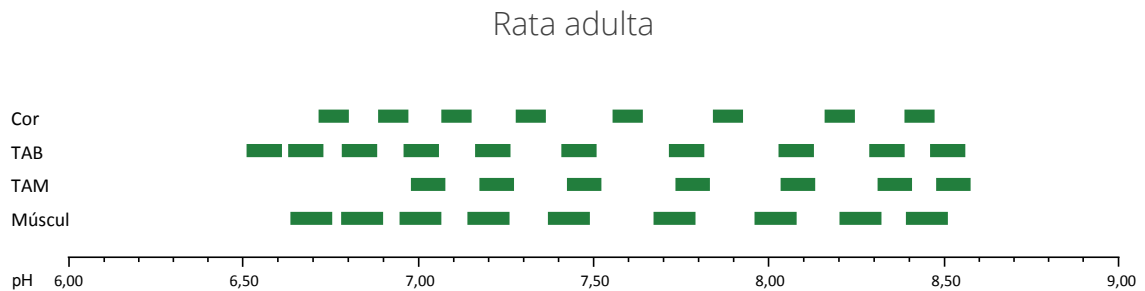


Figura 17. Distribució de les isoformes de pI de l'LPL de diferents teixits de rata adulta. Intervals de confiança de pH de cada isoforma d'LPL de diferents teixits, obtinguts tal i com es descriu a l'apartat de materials i mètodes (4.2.1. Estudi i comparació dels pI de diferents patrons).

Amb l'objectiu de determinar el solapament de la distribució de les isoformes de pI de l'LPL, a la Figura 18 vam representar els intervals de confiança que comparteixen els diferents teixits. El resultat de superposar els intervals de pH de les isoformes de pI de l'LPL de diferents teixits va generar dues agrupacions: la primera –i representada amb rectangles verticals de color verd– és la que engloba els teixits TAB, TAM i múscul, els quals coincideixen en totes les isoformes en menor o major mesura; la segona –rectangles verticals de color taronja– només inclou el cor.

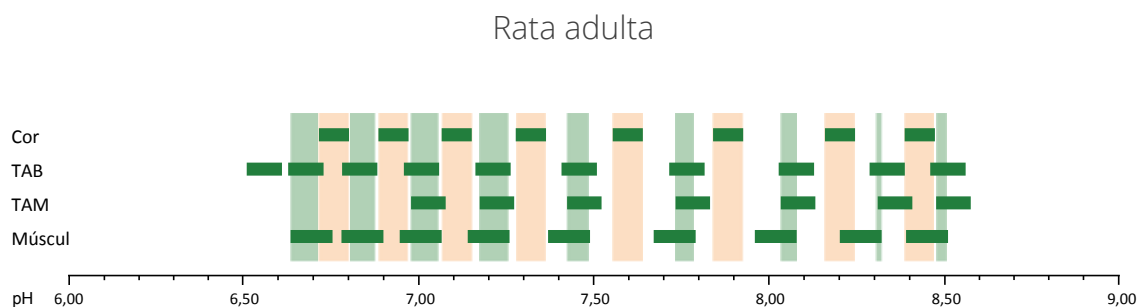


Figura 18. Solapament dels intervals de confiança de les isoformes de pI de l'LPL de diferents teixits de rata adulta. Els intervals de pH en què coincideixen els intervals de les isoformes de pI de l'LPL de TAB, TAM i múscul es van destacar amb rectangles verticals de color verd. Els rectangles verticals de color taronja representen l'interval de les isoformes de pI de l'LPL de cor.

Malgrat que el TAB, el TAM i el múscul no tenen el mateix nombre d'isoformes d'LPL (10, 7 i 9, respectivament), qualsevol isoforma present en més d'un d'aquests teixits va coincidir amb les isoformes dels altres. La distribució de les isoformes del cor rarament coincideixen amb altres isoformes. Sobretot en $pH < 7,5$ la distribució del cor (rectangles taronges) sembla que complementi l'interval del conjunt d'isoformes dels altres teixits (rectangles verds).

Aquestes agrupacions segons els intervals de pH de les isoformes de pI de l'LPL, sobten si les comparem amb el número d'isoformes de cada teixit i on s'acumulen els majors percentatges de distribució de les isoformes. Semblava el TAM, segons aquestes característiques, el teixit que destacaria respecte a cor,

múscul o TAB, ja que té un nombre d'isoformes diferent als altres i els percentatges s'acumulen a un pH força més bàsic (Figura 16).

Estudi de l'abundància relativa

Després de comparar els intervals de pH de les isoformes entre diferents teixits i determinar la similitud entre ells, vam comparar les abundàncies relatives (quantitat de proteïna). Aquesta comparació només es va fer en els teixits en què existia un solapament de totes les isoformes. Així, en el nostre cas, per la conclusió de la Figura 18, vam comparar les abundàncies del TAB, TAM i múscul.

Primer, vam representar els resultats de la distribució en funció del pH de la isoforma, però per a cada teixit (Figura 19). D'aquesta manera, la representació en àrea de l'abundància relativa de cada isoforma quedava plasmada en una mitjana i desviació estàndard i, posteriorment, facilitava la lectura i interpretació dels resultats.

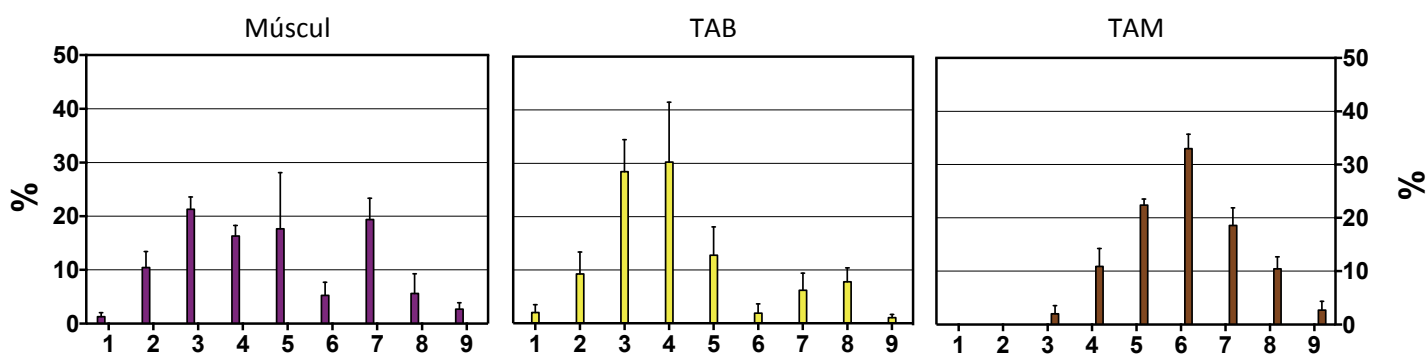


Figura 19. Abundància relativa de les isoformes de pl de l'LPL en teixits de rata adulta. Distribució de l'abundància relativa (%) de cada isoforma (1-9) de l'LPL pels teixits de rata adulta amb solapament d'isoformes: múscul, TAB i TAM. La isoforma 1 correspon al pl més àcid i la isoforma 9 al pl més bàsic. Resultats expressats com a mitjana + desviació estàndard (n=2-3).

Els resultats de la comparació de la distribució (Figura 20) de les isoformes van confirmar l'aspecte descrit anteriorment en els patrons dels teixits: el més destacat va ser la gran diferència de distribució que existeix entre el TAM i els altres dos teixits. Tanmateix, entre TAB i múscul també existeixen diferències, de major o menor grau, en l'abundància relativa.

És important destacar que en les comparacions en què va intervenir el múscul, el nombre de diferències (i el grau de significança) va ser menor que en la comparació entre els teixits adiposos. Aquesta diferència fou deguda al fet que, tal i com ja s'havia descrit anteriorment, l'abundància relativa de les isoformes en múscul va ser força més homogènia que en altres teixits.

Sorpren la gran diferència entre les distribucions entre dos teixits adiposos, el TAB i el TAM. En tant que tots dos són teixits adiposos, aquesta divergència en el patró d'isoformes podria ressaltar les diferències metabòliques de tots dos teixits respecte a la funció de l'LPL (Deshaies et al., 1986; Llado et al., 1999).

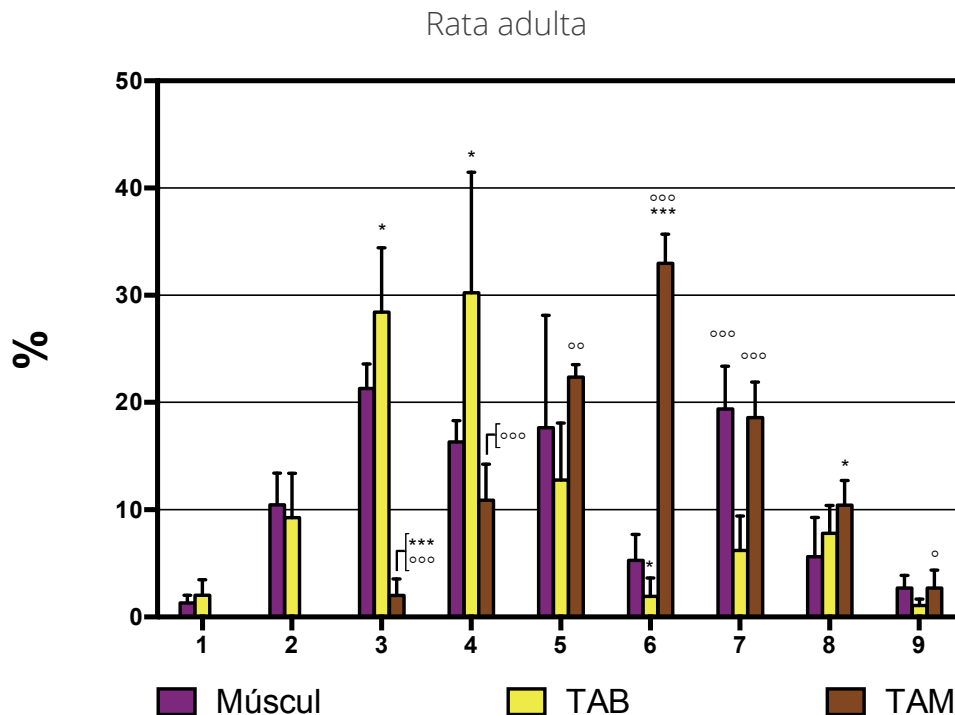


Figura 20. Comparació de l'abundància relativa de cada isoforma de pl de l'LPL entre diferents teixits. En teixits amb les mateixes isoformes d'LPL (1-9), vam comparar la seva abundància relativa en cada teixit mitjançant un test T-student/ANOVA de dades no aparellades. °/* $P < 0.05$; °°/** $P < 0.01$; °°°/*** $P < 0.001$. * respecte "Múscul" i ° respecte "TAB". La isoforma 1 correspon al pl més àcid i la isoforma 9 al pl més bàsic. Resultats expressats com a mitjana + desviació estàndard (n=2-3).

4.5. Discussió: teixits de rata adulta

Primer de tot, hem de descartar que les isoformes de pl de l'LPL siguin degudes a la metodologia, a una conformació de càrregues deguda a la manipulació o al procediment de 2DE. Això és perquè els valors obtinguts dels percentatges d'abundància relativa i dels pl de les isoformes han estat molt constants entre assajos d'un mateix teixit.

A partir dels resultats obtinguts en el patró d'isoformes de pl de l'LPL en un sol cor de rata adulta (Figura 11), sobre, podem assegurar que aquest patró no depèn de variacions al·lèliques i, juntament amb anteriors resultats (Casanovas et al., 2009a), que és originat en part per modificacions posttraduccionals.

Hem descrit la presència d'isoformes en tots els teixits dels quals n'hem pogut purificar parcialment l'LPL. Així, per primera vegada, s'ha descrit la presència d'isoformes de pl de l'LPL no només en cor i plasma postheparínic de rata, sinó també en TAB, TAM i múscul d'aquesta espècie. A partir dels resultats obtinguts de cada teixit, n'hem dissenyat el patró a partir del número d'isoformes i el pl i abundància relativa de cadascuna de les isoformes identificades (Figura 16).

En el cas del fetge, ens ha estat impossible aconseguir purificar parcialment la seva LPL (Figura 14). Tanmateix, la poca activitat lipasa que presenta la purificació parcial del fetge de rata adulta és l'LPL dimèrica captada des del torrent sanguini que encara és activa (Vilaro et al., 1988a). Aquests resultats són coherents amb la bibliografia (Peinado-Onsurbe et al., 1992), en què es descriu que en el fetge no hi ha expressió d'ARNm d'LPL. Tot i que l'LPL del fetge, en una situació control, prové del conjunt de teixits extrahepàtics, no podem deduir el possible patró d'aquest teixit a partir de la imatge obtinguda en el plasma postheparínic de rata (Casanovas et al., 2009a), ja que l'heparina provoca l'alliberament de l'LPL de tots els teixits i l'estabilitza de forma dimèrica (Lookene et al., 1996), mentre que l'alliberament normal de l'LPL dels HSPG és per monomerització i pèrdua d'afinitat per l'ancoratge. Per tant, l'LPL captada pel fetge i l'alliberada per l'heparina poden ser poblacions molt diferents.

D'entre els teixits amb patró d'isoformes descrit, hi ha dos grups segons la coincidència de les isoformes. Un dels grups inclou únicament el cor; l'altre grup inclou TAB, TAM i múscul. Aquesta agrupació és perquè els pl de les isoformes d'aquests tres teixits són el mateix. Però, tot i aquesta coincidència dels pl, els percentatges de distribució de la mateixa isoforma en els diferents teixits, segueixen distribucions molt diferents, possiblement relacionat amb la funció de l'LPL en cada teixit en el moment fisiològic del sacrifici dels animals.

La proporció entre l'activitat LPL de TAB i de múscul ha estat proposada com un índex fisiològic de l'animal (Greenwood, 1985). Aquest valor podria servir per descriure si un animal es troba en una situació postprandial, d'estrès, de dejuni, etc.

L'aspecte més generalista del patró d'isoformes del teixit muscular (Figura 16) possiblement respongui a una major distribució de l'LPL en aquest teixit. Està descrit que en ratolins mutants que només expressen LPL en múscul, els valors de TAG en sang i HDL són normals, fins i tot els valors d'activitat LPL en plasma postheparínic també es normal (Levak-Frank et al., 1997). Així, el múscul sembla ser el gran consumidor de TAG circulants. I en presentar un patró d'isoformes més homogeni, possiblement estigui preparat per poder captar NEFA siguin quines siguin les situacions que afavoreixin una isoforma o una altra. El cor, tot i també ser un teixit tipus muscular, ha resultat tenir un patró molt diferent al múscul, amb el qual no comparteix la distribució de diverses isoformes. Tanmateix, el cor també està descrit com un gran consumidor de TAG. De fet, únicament amb l'LPL expressada en cor de rata es pot mantenir l'efecte en TAG i HDL que produeix tota l'LPL del teixit muscular (Levak-Frank et al., 1999).

No s'ha trobat cap altre estudi amb un plantejament experimental com el nostre: descripció de diferents patrons d'isoformes segons teixit. La manca d'estudis similars, ja siguin de les isoformes de l'LPL o d'altres proteïnes, no dóna referències d'exemples similars. A més, tampoc podem atribuir quines són les diferències de cada teixit que porten a generar diferents conjunts d'isoformes, tant per pl com per abundància de cadascuna de les isoformes.

En els estudis més propers, descriuen que la combinació de PTM pot modificar diversos aspectes de les proteïnes estudiades (Malaney et al., 2017). Però en cap cas, descriu la presència de diferents patrons en diferents teixits.

Tanmateix, la presència de diferents patrons de distribució de l'LPL en diferents teixits destaca l'elevada importància i complexitat en la regulació en tot moment de l'LPL. Així, en una situació control, una condició fisiològica favorable (menjar i beguda *ad libitum* i temperatura de confort), implica diferents requeriments fisiològics en referència a la necessitat de NEFA. I aquestes diferències, possiblement es vegin reflectides en diferents patrons d'isoformes de pI de l'LPL.

5. Patró d'isoformes de pl de l'LPL en teixits de cria de rata

El treball fet fins aquí ha demostrat la presència d'isoformes en teixits extrahepàtics de rata adulta: en cor, TAB, TAM i múscul. Fins i tot, hem descrit les similituds entre els diferents patrons i hem estudiat i comparat la distribució de les isoformes. Però ha quedat la incògnita del fetge: és un teixit que no sintetitza ni expressa LPL (Figura 14), sinó que la poca activitat que en té (Figura 12) és per la proteïna captada del torrent sanguini (Vilaro et al., 1988a).

Tal i com està descrit (Vilaro et al., 1988b), en fetge de nouat de rata s'expressa ARNm d'LPL i presenta valors elevats d'activitat LPL. Per aquest motiu, vam plantejar l'estudi de la distribució d'isoformes de pl de l'LPL en fetge de cries de rata de 15 dies d'edat. Tot i que, inicialment, l'objectiu era la descripció de les isoformes de fetge, també vam aprofitar per treballar amb altres teixits. Per això, durant el sacrifici dels animals, a més del fetge, també en vam extraure el cor i TAM. El TAB no el vam analitzar per dos motius: les dimensions del teixit el van fer molt complicat d'aconseguir i molt difícil d'acumular-ne prou per aconseguir tenir un volum mínim del qual purificar prou LPL, i les cries tant podien ser mascles com femelles (els estudis previs en rata adulta es van fer amb TAB epididimal).

5.1. Anàlisi de l'LPL en teixits extrahepàtics de cria de rata

De la mateixa manera que vam realitzar la descripció del patró d'isoformes d'LPL en teixits de rata adulta, també vam treballar per l'anàlisi de l'LPL en cria de rata. Per tant, el primer pas va ser la purificació parcial de l'LPL del cor i TAM. A partir dels resultats de la purificació parcial de l'LPL, vam estudiar l'enriquiment de la proteïna (tal i com s'explica a la Figura 13) i vam desenvolupar les 2DE tant per WB com per Ag. Els resultats de la purificació parcial de l'LPL, 1DE i 2DE obtinguts per cor i TAM s'agrupen a les Figura 21 i Figura 22, respectivament.

Tant en cor com en TAM, la purificació parcial de l'LPL va funcionar correctament: en les columnes de purificació parcial (A) es descriu com la majoria de proteïnes no queden lligades a l'heparina durant el pas de la mostra (NaCl 0,15 M) i posteriorment es detecta un pic d'activitat LPL (NaCl 1,5 M). En l'anàlisi per 1DE-WB (B), es va veure una potent banda de 56 kDa. I no només es va purificar parcialment l'LPL, sinó que, a més, la imatge del gel de proteïnes tenyides va indicar que la complexitat de la reserva aconseguida va ser força baixa, ja que van aparèixer poques bandes. Entre aquestes bandes, la de l'LPL era fàcilment identificable. Per tant, vam poder purificar parcialment l'LPL dels dos teixits obtinguts de les cries de 15 dies i detectar-la per WB (B).

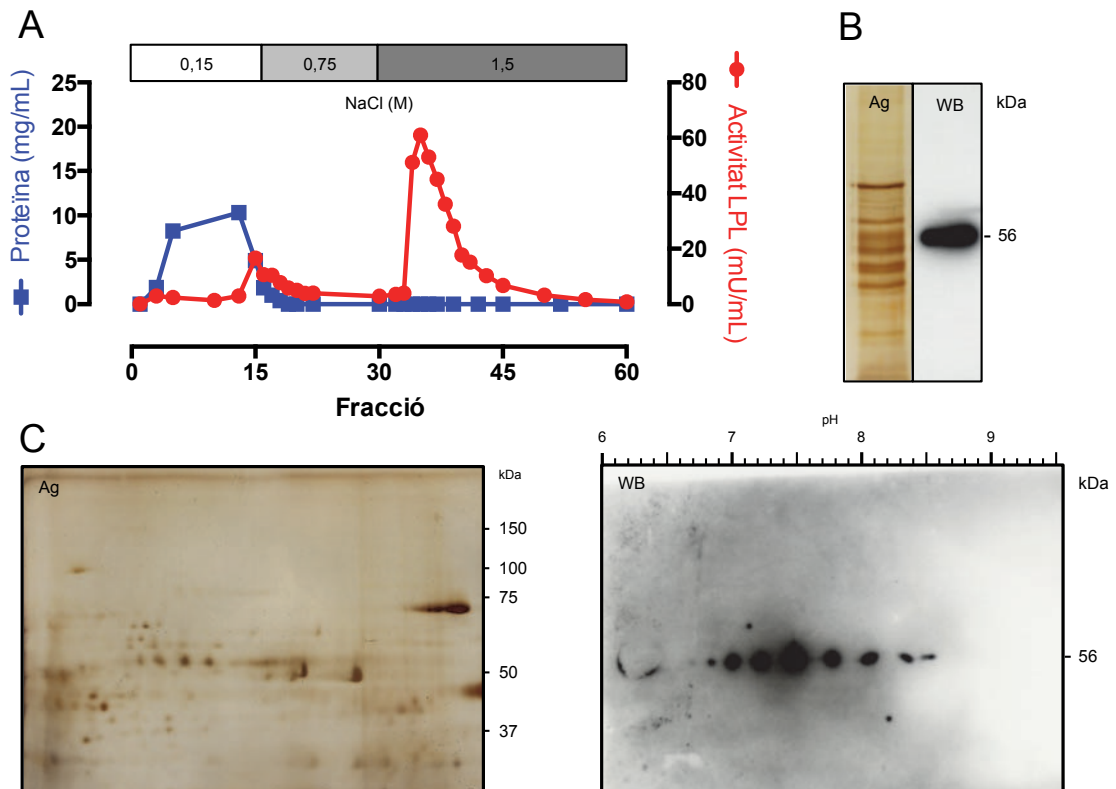


Figura 21. Isoformes de pI de l'LPL de cor de cria de rata. Purificació de l'LPL de cor de cria de rata (A) (n=40) i anàlisi de la reserva de l'LPL, tant per 1DE (B) com per 2DE (C). Es van carregar fins a 300 µg de proteïna total a cada 2DE. Es va mantenir la traçabilitat del pH (escala superior a la imatge del WB) tal i com es descriu en l'apartat de materials i mètodes (4.1. Creació del patró d'isoformes de pI de l'LPL). kDa és el marcador de pes molecular aparent i el 56 assenyaleta el pes molecular aparent de l'LPL.

Els resultats de les 2DE-WB (C) van demostrar que en teixits de rata de 15 dies de vida ja existeixen isoformes de pI de l'LPL. En cor i TAM, es va poder identificar fins a 9 i 7 isoformes, respectivament. Aquestes isoformes es van distribuir aproximadament en un interval des de pH 6,5 fins a 8,5 i tenien el pes molecular aparent teòric de l'LPL. Com en els anteriors assajos de 2DE fets, l'alta qualitat en la resolució de la metodologia de 2DE va determinar perfectament isoformes de molta baixa abundància relativa, a més d'obtenir unes imatges molt netes i sense creuament d'altres proteïnes per part de l'anticòs 5D2.

Pel que fa als resultats obtinguts per Ag, de nou els resultats obtinguts van ser correctes i coherents amb la descripció de cada reserva feta en 1DE: el nombre de proteïnes detectades va ser relativament baix, ja que la complexitat de la mostra era força reduïda. En tots dos casos, les isoformes de pI de l'LPL van ser fàcilment identificables en el gel entre l'enrenou de les altres proteïnes, tenides inespecíficament per la tècnica.

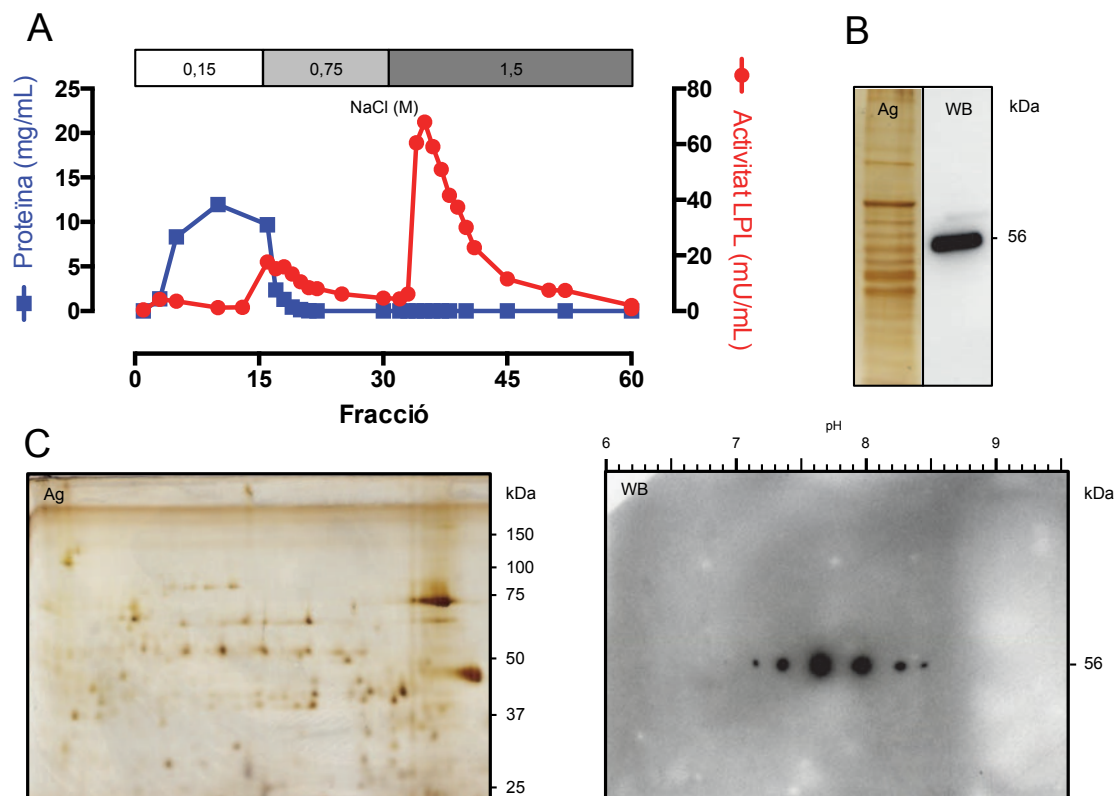


Figura 22. Isoformes de pI de l'LPL de TAM de cria de rata. Purificació de l'LPL de TAM de cria de rata (A) (n=50) i anàlisi de la reserva de l'LPL, tant per 1DE (B) com per 2DE (C). Es van carregar fins a 300 µg de proteïna total a cada 2DE. Es va mantenir la traçabilitat del pH (escala superior a la imatge del WB) tal i com es descriu en l'apartat de materials i mètodes (4.1. Creació del patró d'isoformes de pI de l'LPL). kDa és el marcador de pes molecular aparent i el 56 assenjala el pes molecular aparent de l'LPL.

5.2. Patró d'isoformes de pI de l'LPL en cria de rata

Un cop l'estudi de les isoformes d'LPL de fetge de cria de rata es va haver de descartar, vam seguir amb l'estudi en altres teixits. Tant per cor com per TAM, la purificació parcial i enfocament de les isoformes havia estat correctament desenvolupat. Per tant, vam poder dissenyar els patrons de tots dos teixits a través dels seus pI i abundàncies relatives.

Una vegada fet el buidatge de la informació obtinguda en els diferents assajos 2DE-WB i processats els valors d'abundància relativa i pI de les isoformes, vam dissenyar els patrons del cor i el TAM de cria de rata (Figura 23).

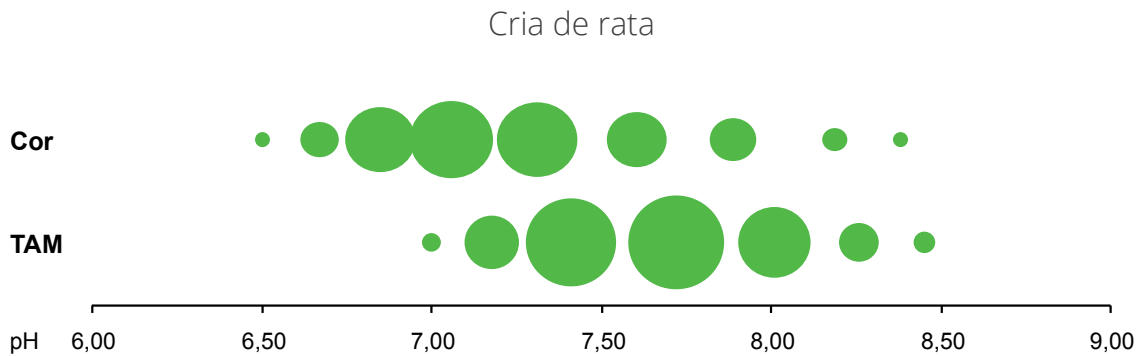


Figura 23. Patró d'isoformes de pI de l'LPL de teixits de cria de rata. Representació de les isoformes de pI de cor i TAM segons les mitjanes del seu pI (eix horitzontal) i de la seva abundància relativa (àrea de cada isoforma de l'LPL). Resultats obtinguts a partir de diverses exposicions de cada WB en 2DE (n=3).

A la Figura 23, cada isoforma de l'LPL ve determinada pel seu punt isoelèctric (eix horitzontal) i pel seu percentatge d'abundància relativa (àrea del cercle respecte el total de la superfície de les esferes d'un mateix teixit). Així, el pI de qualsevol isoforma es pot comparar amb el de qualsevol altra, de tots dos teixits. Malauradament, en aquesta representació, les abundàncies relatives només poden comparar-se entre isoformes del mateix teixit. Aquesta diferència entre el pI i l'abundància relativa és deguda al sistema de descripció del patró.

El resultat obtingut en el patró de les isoformes de pI de **cor** va descriure un total de 9 isoformes distribuïdes en un interval de pH des de 6,52 fins a 8,31. Les tres isoformes més abundants es van descriure entre pH 6,85 i 7,31, i concentraven el 70% de l'abundància relativa de l'LPL d'aquest teixit.

En el cas del **TAM** de cria de rata, el patró resultant va estar format per un total de 7 isoformes. A diferència de les del cor de cria, la seva distribució tenia un inici d'interval marcadament més bàsic ja que la isoforma més àcida no es va detectar fins al pH 7, tot i que la isoforma més bàsica del TAM tenia un pI similar a la més bàsica del cor: 8,45. La major quantitat relativa de proteïna es va trobar en la isoforma central, de pI 7,72 i representava un 32% del total. Com més allunyades d'aquesta isoforma central, les altres isoformes acumulaven menys abundància relativa.

Així, aquests resultats mostren que en rates de 15 dies de vida, l'LPL en teixits com ara el cor i el TAM ja presenten isoformes de pI. A partir d'aquests resultats vam poder treballar en la comparació dels patrons obtinguts, tant entre els dos teixits de cria, com entre el mateix teixit en diferents edats de l'animal.

5.2.1. Comparació dels patrons entre teixits

Com en el cas dels teixits de rata adulta, primer de tot vam analitzar l'homoscedasticitat de variàncies i la normalitat de residus de tots dos teixits: cor i TAM.

En tots dos casos, tant l'homoscedasticitat de variàncies com la normalitat de residus van obtenir resultats no significatius. Per tant, vam procedir amb

l'anàlisi i comparació dels pI i l'abundància relativa de les isoformes de l'LPL. Tot i la no significació de la variància i dels residus, aquest estudi també el vam prendre com a prospectiu, ja que seria necessari un nombre molt més elevat de rèpliques per donar prou robustesa a l'estudi.

Estudi del pI

Primer de tot, tal i com havíem fet en els teixits de les rates adultes, vam comparar els intervals de confiança obtinguts de l'estudi estadístic dels pI de cada teixit.

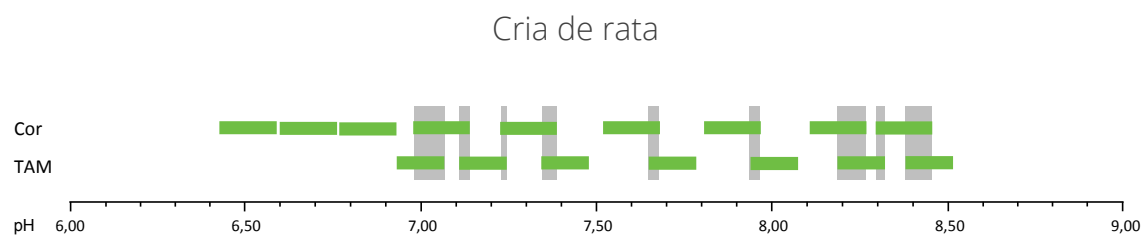


Figura 24. Solapament dels intervals de confiança de les isoformes de pI de l'LPL de diferents teixits de cria de rata. Representació dels intervals de pH de cada isoforma d'LPL de diferents teixits. Els rectangles verticals grisos són la projecció dels intervals de pH en què coincideixen les isoformes de pI de cor i TAM.

Vam estudiar el solapament de les isoformes dels dos teixits de cria de rata per comparació dels intervals de confiança. Els resultats d'aquesta comparació va resultar que totes les isoformes de TAM es van solapar, en menor o major mesura, amb isoformes del cor (Figura 24). Tot i que semblava ser un bon resultat, en veure més detalladament el solapament, vam detectar que diverses isoformes tenien solapaments amb dues isoformes de l'altre teixit i, sovint, aquest solapament era força reduït. Per aquests motius, afirmar quina era la parella de cada isoforma era una decisió poc ferma i amb diversos inconvenients, fos quina fos la resolució que es prengué.

Per tot això, la conclusió que s'extrau de la comparació dels pI de les isoformes de cor i TAM de cria de rata és que, malgrat solapar-se en diversos punts, la forma en què ho fan (qualitativament i quantitativa) no és significativa per a determinar si tenen les mateixes isoformes. I per tant, vam considerar que el cor i el TAM de cria de rata tenen patrons diferents d'isoformes. Aquesta diferència en els pI de les isoformes d'aquests dos teixits també la vam descriure en el cas de la rata adulta (Figura 18).

En alinear la distribució dels pI de cada isoforma en les dues edats (cria i adult), vam poder comparar si els patrons de distribució de l'LPL en cor i en TAM mantenen les mateixes isoformes pel que fa al seu pI o varien. Vam traçar en verd l'àrea compartida per dues isoformes de TAM i per cor (Figura 25).

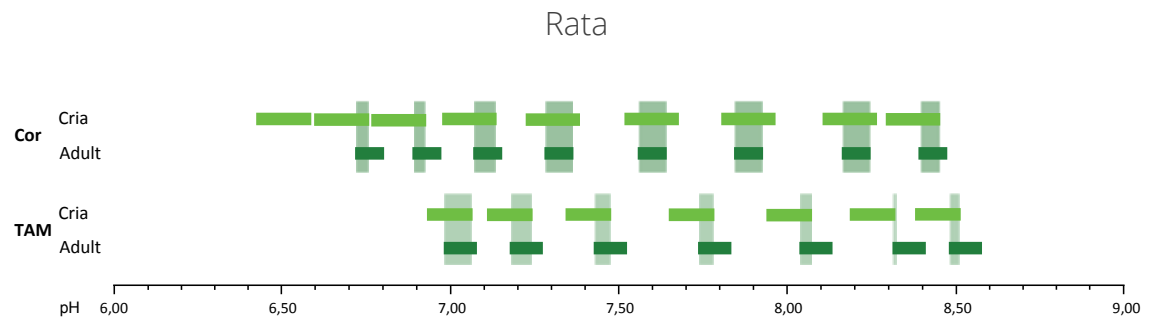


Figura 25. Solapament dels intervals de confiança de les isoformes de pI de l'LPL entre cria i adult. Representació dels intervals de pH de cada isoforma d'LPL de cor i TAM de rata, adulta i cria. Els rectangles verticals verds són l'interval de pH que, en les diferents edats, comparteixen les isoformes de pI de l'LPL en cor o TAM.

Si primer s'analitza el resultat que vam obtenir en la comparació del **TAM**, vam poder traçar àrees en comú a totes les isoformes presents, per mínim que fos. Tot i que també alguna isoforma es va solapar amb més d'una de l'altre teixit, era un cas puntual i fàcilment identificable la dinàmica dels emparellaments entre totes dues edats diferents de l'animal.

En el cas del **cor**, el solapament va ser tan o més evident que en el TAM. També totes les isoformes d'un dels teixits es van solapar amb les isoformes de l'altre. En aquesta segona comparació, l'interval de solapament va ser més ampli a tots els solapaments possibles. També com en el TAM, una de les isoformes va solapar les distribucions amb dues isoformes de l'altre teixit, però també era molt evident quina era la tendència d'emparellament de les isoformes de les dues condicions, cria i adult.

El resum de la comparació dels pI de les isoformes de cor i TAM és que les isoformes descrites en rata adulta mantenen el mateix patró de distribució que el mateix teixit de rata de 15 dies de vida. Per aquesta conclusió, va ser interessant també comparar els percentatges de distribució de cada isoforma. Aquesta anàlisi acabaria d'informar sobre la similitud dels patrons d'isoformes en diferents moments del desenvolupament de l'animal, tant per a cor com per a TAM.

Estudi de l'abundància relativa

La Figura 26 mostra per separat la distribució de l'abundància de cada isoforma del cor de rata, ja sigui d'animals adults o de cries. Tal i com ja havíem descrit anteriorment, el cor d'adult concentrava la seva abundància d'LPL en l'interval de pH d'entre 6,88 i 7,31, en només 3 de les 9 isoformes. Les restants 6 isoformes no acumulaven ni un 10% de l'abundància relativa del teixit. En cria, la distribució va ser, aparentment més uniforme entre les isoformes, tot i que les isoformes més abundants van resultar també les de l'interval de pH 6,88-7,31.

Cor rata

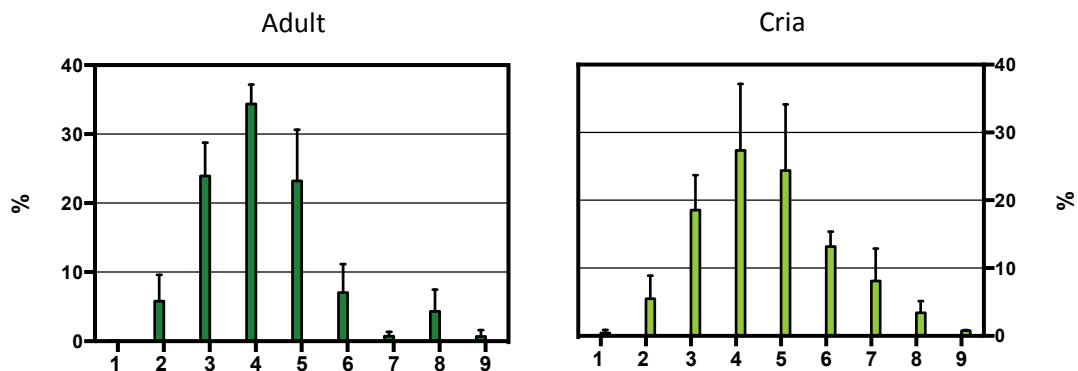


Figura 26. Abundància relativa de les isoformes de pl de l'LPL de cor de rata. Distribució de l'abundància relativa (%) de cada isoforma de l'LPL (1-9), tant per rata adulta com per cria. Resultats expressats com a mitjana + desviació estàndard (n=3-4). La isoforma 1 correspon al pl més àcid i la isoforma 9 al pl més bàsic.

Per representar més visualment les possibles diferències entre les abundàncies relatives de les isoformes del cor, vam representar les abundàncies l'una al costat de l'altra (Figura 27). El resultat d'aquesta comparació, adult contra cria, va concloure que 4 de les 9 isoformes van presentar abundàncies relatives diferents entre cria i adult. Així, les isoformes 3 i 4 (Figura 27) van ser més abundants en adult, en compensació de les isoformes 6 i 7, les quals tenien menor abundància.

Cor rata

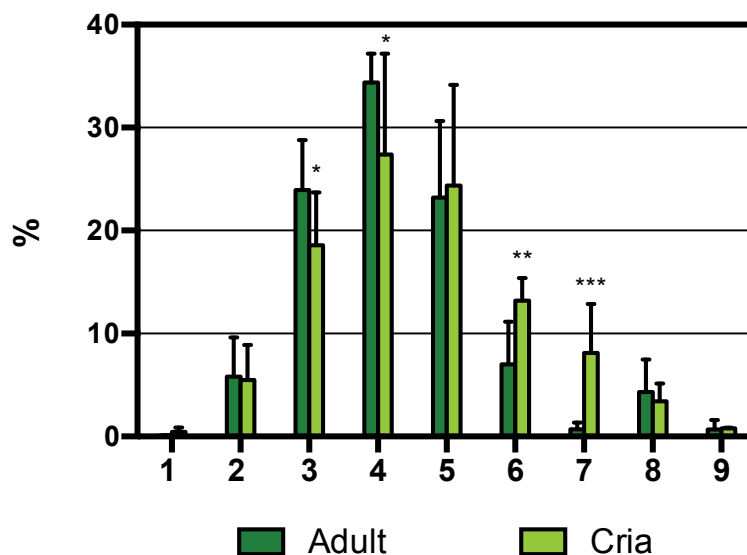


Figura 27. Comparació de l'abundància relativa de les isoformes de l'LPL de cor de rata. Representació dels percentatges (%) de les isoformes d'LPL (1-9) de cor de cria de rata (verd clar) i de rata adulta (verd fosc). Resultats expressats com a mitjana + desviació estàndard (n=3-4). Comparació mitjançant un test T-student de dades no aparellades. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. La isoforma 1 correspon al pl més àcid i la isoforma 9 al pl més bàsic.

De la mateixa manera que en el cor, en TAM primerament vam representar la distribució de l'abundància relativa de les isoformes d'adult i de cria (Figura 28 i Figura 29). En aquest cas, a diferència del cor, les dues condicions semblaven tenir distribucions de l'LPL molt similars.

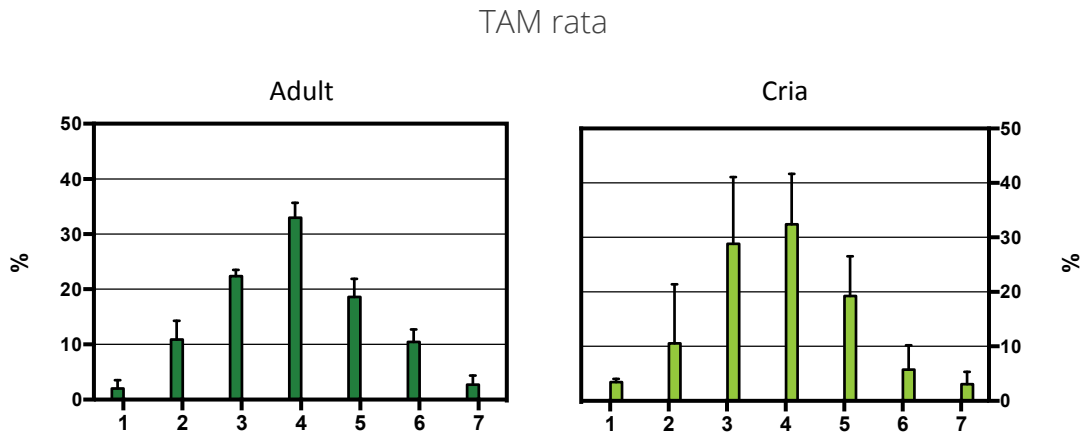


Figura 28. Abundància relativa de les isoformes d'LPL de TAM de rata. Distribució de l'abundància relativa (%) de cada isoforma de l'LPL (1-7), tant per rata adulta com per cria. Resultats expressats com a mitjana + desviació estàndard (n=3). La isoforma 1 correspon al pI més àcid i la isoforma 7 al pI més bàsic.

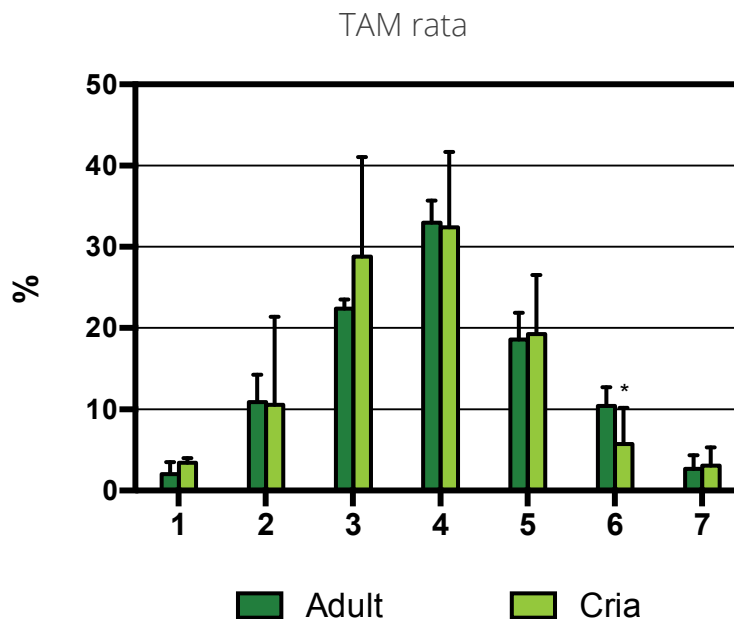


Figura 29. Comparació de l'abundància relativa de les isoformes de l'LPL de TAM de rata. Representació dels percentatges (%) de les isoformes d'LPL (1-7) de TAM de cria de rata (verd clar) i de rata adulta (verd fosc). Resultats expressats com a mitjana + desviació estàndard (n=3-4). Comparació mitjançant un test T-student de dades no aparellades. * $P < 0.05$. La isoforma 1 correspon al pI més àcid i la isoforma 9 al pI més bàsic.

En el TAM, el resultat que vam obtenir de les comparacions de les abundàncies relatives de l'LPL en els dos moments del desenvolupament va ser molt diferent al del cor. Únicament una isoforma va presentar diferències mínimes; tota la resta,

seguien distribucions estadísticament iguals. La isoforma que va resultar significativa va ser la sisena (pl 8,31), la qual presentava major abundància en l'edat adulta que en la cria. Així com en el cor, vam veure que unes isoformes compensen la variació de les altres en cada moment del desenvolupament, en el cas del TAM no va existir una isoforma que, en les cries fos més abundant que en edat adulta per compensar la diferència de la isoforma 6. Aleshores, aquesta variació va quedar diluïda entre diferents isoformes, les quals, malgrat van mostrar una tendència a tenir major abundància, no va ser prou per a detectar-ne estadísticament la variació.

5.3. Purificació parcial de l'LPL de fetge de cria de rata

En paral·lel al cor i al TAM, vam tractar el tercer teixit extret en aquest model experimental: el fetge. La purificació parcial d'aquest teixit (Figura 30) es va comportar de forma molt diferent a com s'havia desenvolupat en el cas del fetge de rata adulta (Figura 12). Tot i que en tots dos casos va existir un important pic d'activitat LPL eluïda durant el tampó de rentat (0,75 M NaCl), principalment deguda a HL, va ser en l'eluït (1,5 M NaCl) on es va veure el canvi més rellevant. En el cas de la purificació de l'LPL de fetge de cries de rata va aparèixer un pic d'activitat LPL de més de 40 mU/mL, mentre que en l'adult aquest pic no va assolir les 15 mU/mL.

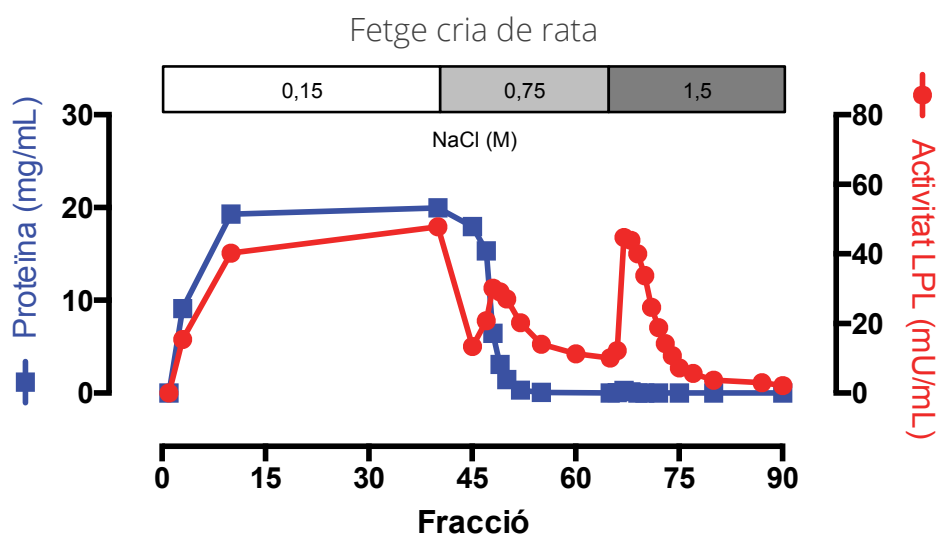


Figura 30. Purificació parcial per cromatografia d'afinitat de l'LPL de fetge de cria de rata. Tal i com s'explica a la **Figura 13**, es va quantificar la proteïna total (quadrats blaus) i l'activitat LPL (cercles vermells) en diferents moments d'un gradient creixent de NaCl (eix superior, en gris). Com a referència, la purificació parcial de l'LPL del fetge de rata adulta (**Figura 12**).

De la purificació de l'LPL de fetge de cria, també va ser destacable el fet que, durant el pas de la mostra de la columna d'heparina-*Sepharose*, va aparèixer una activitat LPL molt alta (NaCl 0,15 M). Aquesta activitat no era probable que fos deguda a LPL no retinguda per l'heparina, ja que la columna semblava que havia funcionat correctament (es va assolir un pic d'activitat LPL molt gran en l'eluït), ni

tampoc és probable que s'hagués saturat la columna perquè les primeres fraccions ja van presentar activitat enzimàtica. Conseqüentment, aquesta activitat LPL trobada a NaCl 0,15 M havia de ser d'alguna lipasa diferent a l'LPL o la HL, amb molt baixa afinitat a l'heparina: vam descartar l'LPL i la HL (Figura 31).

Per descriure si l'activitat LPL obtinguda en els diferents punts de la purificació parcial en cromatografia d'afinitat és deguda a HL o LPL, vam valorar l'activitat LPL de diverses fraccions, les quals es van incubar prèviament amb diferents anticossos (Figura 31). Mitjançant aquest pretractament de les mostres, s'inhibeix específicament l'activitat de la lipasa objectiu: l'anticòs R21 inhibeix la HL i el 5D2, l'LPL.

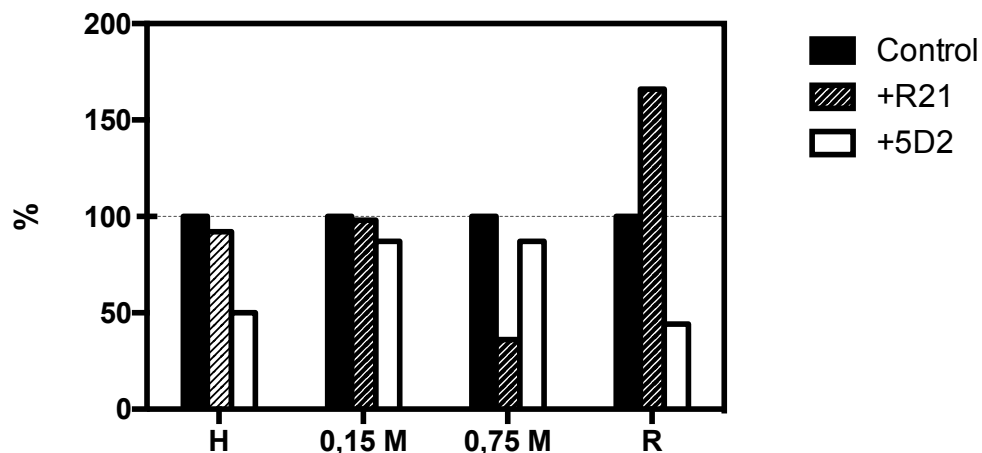


Figura 31. Inhibició de l'activitat LPL en fraccions de la purificació parcial de l'LPL.

Dels resultats de la purificació parcial de l'LPL de fetge de cria (Figura 30), es va tractar diverses fraccions en presència d'anticossos: R21 per lipasa hepàtica (fons ratllat) o 5D2 per LPL (fons blanc). Els punts estudiats van ser l'homogeneïtzat del fetge de cria (H), el pas de la mostra per la columna (0,15 M), el rentat de la columna (0,75 M) i la reserva obtinguda en l'elució (R). Els resultats de la inhibició es presenten en % respecte la mostra control (la mateixa mostra però sense cap anticòs, en negre).

Així, es va poder demostrar quina lipasa hi havia, majoritàriament, en cada moment de la purificació. Els resultats de la valoració d'activitat LPL amb la incubació dels anticossos (Figura 31), van demostrar que:

- L'homogeneïtzat (**H**) tenia una part important d'activitat LPL aportada per l'LPL i, en menor mesura, per la HL.
- La mostra després del pas per la columna (**0,15 M**) tenia activitat, però no es pot considerar deguda ni a l'LPL ni a la HL. Aquests resultats van donar més força a l'existència d'una lipasa diferent a l'LPL o HL amb molt baixa o nul·la afinitat per l'heparina.
- El rentat (**0,75 M**), fraccions amb proteïnes de baixa afinitat per l'heparina, principalment tenia HL, ja que l'anticòs R21 va reduir en gran mesura l'activitat enzimàtica, a diferència de l'anticòs 5D2, que pràcticament no semblava afectar l'activitat LPL de la mostra.

- L'eluit (**R**) no contenia activitat deguda a HL perquè l'anticòs R21 va fer augmentar-ne l'activitat. Aquest augment molt possiblement fos degut a l'Apo C-II (cofactor de l'LPL) afegida amb el sèrum anti-HL, ja que el control sense anticòssos es va fer amb tampó diluent de la mostra (EDH). A diferència de la incubació amb R21, la mostra tractada amb 5D2 va perdre una gran part de la seva activitat LPL.

Una vegada s'havia confirmat que la columna de purificació parcial de l'LPL havia funcionat correctament, vam prosseguir amb la identificació de l'LPL. Primer de tot, amb els resultats d'activitat LPL (Figura 30), vam generar la reserva de l'LPL a partir de les fraccions de l'eluit amb major concentració d'LPL. Tot seguit, vam analitzar per 1DE si l'enriquiment havia estat suficient per a detectar-ne l'LPL.

Els resultats de l'anàlisi van mostrar, en el gel tenyit amb plata, que un gran nombre de proteïnes del fetge de cria de rata tenen alta afinitat per l'heparina i van eluir juntament amb l'LPL, de la mateixa manera que va passar en la purificació del fetge de rata adulta. Com a resultat, la complexitat de la mostra va ser molt elevada.

Per altra banda, en l'anàlisi per 1DE-WB de la reserva del fetge de cria de rata vam detectar una clara banda a una alçada de 56 kDa. Aquesta única banda va demostrar que en el cas d'aquest teixit podíem purificar parcialment l'LPL i detectar-la per WB. La banda d'LPL immunodetectada va ser una marca prou intensa i comparable amb altres senyals obtinguts d'altres purificacions d'LPL d'altres teixits (p.e. cor o TAM de cria de rata, Figura 21 i Figura 22 respectivament).

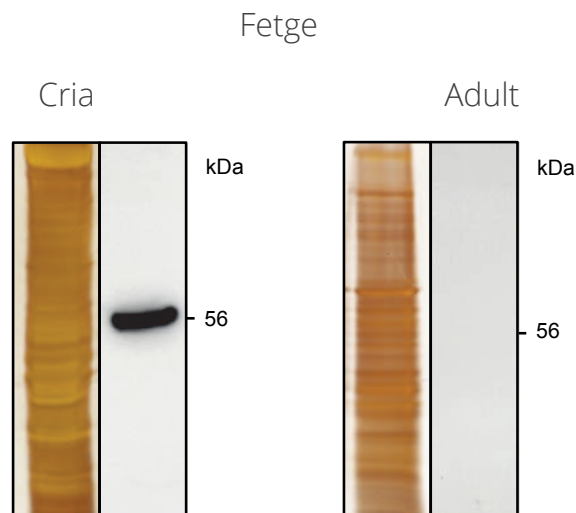


Figura 32. 1DE de la purificació parcial de l'LPL de fetge de cria de rata. Les imatges van ser obtingudes per Ag (esquerra) i per WB contra LPL (dreta). En tots els casos, vam fer una anàlisi de la purificació parcial tal i com es descriu a la Figura 4. kDa assenjala el pes molecular aparent de l'LPL (56 kDa). El resultat del fetge de rata adulta es va recuperar de la Figura 5.

En la comparació entre els resultats obtinguts en la purificació parcial de l'LPL de fetge de rata adulta i cria, és quan va destacar la principal diferència entre aquestes dues situacions d'un mateix teixit: l'aparició d'una banda en el 1DE-WB com a resultat de l'enriquiment de l'LPL de fetge de cria, ja que en rata adulta va ser impossible obtenir-ne cap resultat positiu. Aquesta diferència entre els 1DE-WB va ser coherent amb els resultats obtinguts en la purificació parcial per cromatografia d'afinitat: mentre que en rata adulta el pic d'activitat LPL en l'eluit va ser molt reduït (Figura 12), en fetge de cria tenia els valors habituals d'activitat d'altres purificacions parcials d'LPL d'altres teixits. En els resultats de Ag, en tots dos casos, la complexitat de la reserva va ser elevada: un gran nombre de bandes d'altres proteïnes diferents a l'LPL però amb alta afinitat per l'heparina.

En resum, aquests resultats van ser coherents, tal i com està descrit (Vilaro et al., 1988b), amb la diferent expressió de l'LPL en fetge de rata en determinades circumstàncies.

5.4. Anàlisi per 2DE de l'LPL de fetge de cria de rata

Després d'haver confirmat la presència d'LPL a la reserva generada del fetge de cria de rata, vam aplicar la mostra en un enfocament 2DE, tant per WB com per Ag. Vam fer servir el mateix procediment tal i com s'havia aplicat a altres teixits, tant de rata adulta com de cria de rata.

El resultat obtingut per 2DE-WB (Figura 33) va mostrar que el fetge de cria també té isoformes de pI de l'LPL. Aquestes isoformes van ser, a primera impressió, molt diferents a les descrites en altres teixits, ja que no només el nombre va ser molt més reduït (3 isoformes) sinó que també el seu interval de distribució va ser molt diferent: es distribuïen des de pH 8,5 fins a 8,8. En tota la resta de l'interval de distribució no es va detectar més isoformes d'LPL. Basant-nos en l'experiència en 2DE-WB prèvia a aquests resultats (alta sensibilitat de l'assaig i detecció d'isoformes molt poc abundants), era prou segur afirmar que en el cas del fetge de cria la distribució de les isoformes de pI de l'LPL només era aquest estret interval.

En avaluar la 2DE-Ag, vam veure un gran nombre de taques al gel, les quals eren part de les proteïnes presents en la reserva de l'LPL de fetge de cria de rata. Aquestes proteïnes, que es van enfocar juntament amb l'LPL parcialment purificada, semblava que no s'havien enfocat correctament o, com a mínim, de la forma habitual com resulten els IEF d'altres reserves d'LPL (Figura 15). Aquesta idea es basava en què les proteïnes no es van veure ben enfocades en el seu pI ni en el seu pes molecular aparent. A més, l'aspecte del gel feia pensar que la proteïna carregada en l'enfocament havia sobrepassat el límit de proteïna total possible. Això s'explica perquè la longitud de la tira de l'IEF determina la quantitat de mostra que l'assaig pot suportar sense provocar funcionament incorrecte en la metodologia (precipitació de la mostra, enfocament incorrecte, etc.).

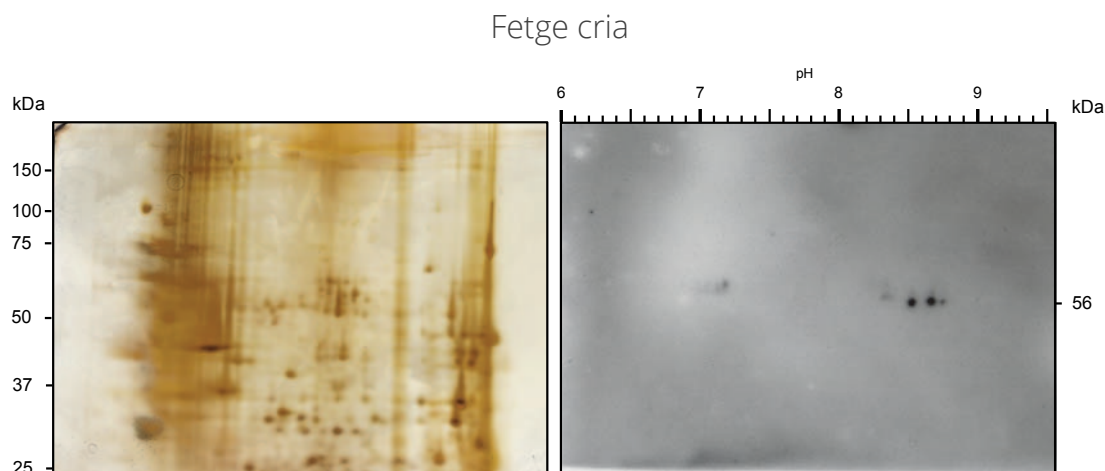


Figura 33. 2DE de la reserva d'LPL de fetge de cria de rata. Imatges dels resultats del Ag (esquerra) o del WB (dreta) en tires d'IEF de pH 6-11 en 11 cm. Es van carregar fins a 300 µg de proteïna total per assaig. Es va mantenir la traçabilitat del pH (escala superior a la imatge de WB) tal i com es descriu en l'apartat de materials i mètodes (**4.1. Creació del patró d'isoformes de pI de l'LPL**). kDa és el marcador de pes molecular aparent i el 56 assenyalava el pes molecular aparent de l'LPL.

Per això, vam ajustar les variables que podien afectar els resultats de l'IEF (volum total de mostra, temps d'enfocament, etc.) i vam tornar a enfocar la mostra. Tanmateix, en les següents repeticions de l'IEF, no vam aconseguir resultats positius ni en l'enfocament de les proteïnes ni en la detecció de l'LPL. Com a conseqüència de l'enfocament incorrecte per 2DE de la mostra de la reserva del fetge de cria de rata, posat de manifest pel tint amb plata, els resultats sobre la presència, nombre i distribució de les isoformes de l'LPL obtinguts per 2DE-WB, no els podíem acceptar com a definitius.

Tal i com ja havíem plantejat anteriorment, la metodologia de l'IEF és un equilibri de la mostra amb què es treballa: per una banda, és necessari carregar gran quantitat d'LPL; per l'altra, l'assaig té una capacitat màxima de proteïna total que pot assumir. Si l'LPL en la reserva del fetge de cria de rata es podia detectar per 1DE-WB, també s'hauria de poder veure en 2DE-WB. Però les característiques de la mostra interfereixen en el correcte desenvolupament de l'IEF, i molt possiblement fos la quantitat total de proteïna que impedia l'enfocament correcte de l'LPL, ja que la matriu de l'enfocament (tampó, preparació de la mostra, etc.) va ser la mateixa que en tots els altres teixits amb què s'havia treballat. Per tant, calia tractar la reserva per tal de reduir-ne la complexitat proteica, sense afectar –en la mesura del possible– l'LPL present a la mostra.

5.5. Immunoprecipitació de l'LPL

La immunoprecipitació (IP) es va plantejar, en el cas del fetge de cria de rata, com a metodologia per a una segona purificació de la reserva de l'LPL a fi de reduir la complexitat proteica de la mostra. Anteriorment ja s'havia plantejat la immunoprecipitació de l'LPL en mostres de plasma postheparínic de rata (Casanovas et al., 2008). Tot i que els resultats d'aquells experiments van ser

negatius, les variables amb què es va treballar anteriorment eren molt diferents. Una gran millora va ser el canvi d'anticòs a utilitzar, ja que el P66, posteriorment, es va descobrir que reconeix l'anti-trombina III (ATIII) a més de l'LPL (Casanovas et al., 2008).

5.5.1. Assajos previs per a la immunoprecipitació

En tots els casos de diferents metodologies d'IP que vam estudiar, la composició del tampó d'incubació/lisi de la mostra estava optimitzada per al tractament de les mostres (lisi del cultiu cel·lular, dilució de l'homogeneïtzat,...) i correcte reconeixement entre els diferents elements de la IP. És per això que vam decidir avaluar la capacitat de les nostres mostres (LPL provinents de la purificació parcial per heparina-*Sepharose*) per funcionar correctament ens els punts clau implicats indirectament en la IP:

1. la dissolució en tampó de lisi/incubació de la mostra posterior a la precipitació,
2. la precipitació de la mostra en tampó de lisi/incubació,
3. la detecció per 1DE-WB en tampó de lisi/incubació.

Un gran nombre de procediments d'IP, independentment de la proteïna de objectiu, mantenen unes condicions generalitzades del tampó d'incubació/lisi. Per exemple, normalment inclouen en el tampó certa concentració de clorur de sodi ($\cong 150$ mM) i algun detergent ($\cong 1\%$ v/v), tot en una solució tampó.

Per això, vam treballar amb reserva d'LPL de TAB de rata per avaluar la idoneïtat del tampó de lisi/incubació en els punts de manipulació de la mostra (Figura 35). Aquesta mostra, que partia d'un tampó amb una elevada concentració de clorur sòdic (1,5 M) i glicerol (30% v/v), va ser tractada tal i com s'explica a la Figura 34.

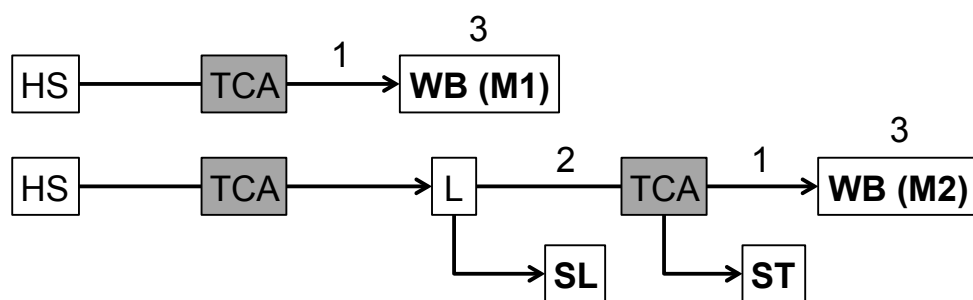


Figura 34. Esquema de l'anàlisi dels punts implicats indirectament en la IP. Anàlisi de diferents punts clau de la IP de l'LPL: 1, dissolució en tampó de lisi/incubació de la mostra posterior a la precipitació; 2, precipitació de la mostra en tampó de lisi/incubació; 3, detecció per 1DE-WB en tampó de lisi/incubació. HS, mostra provinent de la reserva de TAB de rata; TCA, precipitació de la mostra per TCA; WB (M1 i M2), mostres dissoltes en 50 μ L de tampó de lisi, més tampó de mostres de SDS-PAGE; L, mostra dissolta en 500 μ L de tampó de lisi; SL, 10% del volum de L; ST, 10% del volum de sobrenedant posterior a la centrifugació del TCA. En negreta, mostres que es van analitzar per WB contra LPL (Figura 35).

Els resultats de la 1DE-WB (Figura 35) van revelar que era perfectament possible dissoldre l'LPL en tampó de lisi, posteriorment a la precipitació amb TCA (Figura 34 – M1). Fins i tot, la mostra dissolta en tampó de lisi es va poder tornar a precipitar amb TCA, dissoldre-la en tampó de mostres per a WB i encara ser detectable (Figura 34– M2), sense detectar-la al SN.

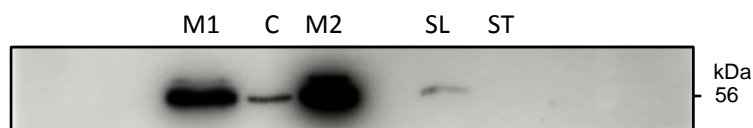


Figura 35. 1DE de l'LPL de l'anàlisi dels punts implicats indirectament en la IP. WB contra l'LPL. M1, mostra precipitada i dissolta en tampó de lisi; C, control positiu d'LPL bovina; M2, mostra tornada a precipitar després d'haver-la dissolt en tampó de lisi; SL, 10% mostra dissolta en tampó de lisi abans de precipitar; ST, 10% de la mostra després de centrifugar el TCA. kDa assenyalava el pes molecular aparent de l'LPL (56 kDa).

Per tant, el procés d'immunoprecipitació no es veu limitat per la dissolució de la mostra en el tampó de lisi ni en la seva posterior manipulació (precipitació i detecció per 1DE-WB).

Una vegada ja vam confirmar que els passos del procediment d'IP estudiats (precipitació, dissolució i detecció) funcionaven correctament, vam seguir amb l'enriquiment mitjançant la IP de l'LPL de les reserves de les columnes d'heparina-*Sepharose*.

5.5.2. Immunoprecipitació en matriu de *Sepharose*

IP-1: Suport en columna d'IP

En aquest procediment, l'anticòs de captura de l'LPL va ser unit covalentment a la proteïna G; d'aquesta manera, a l'anàlisi per WB de l'eluit només s'obtidria una sola banda (LPL, pes aparent de 56 kDa) i no es detectaria les cadenes pesants de l'anticòs (5D2, pes aparent de 50 kDa). Si en l'eluit també hi hagués el 5D2, l'anticòs secundari en la incubació del WB s'uniria tant a l'anticòs primari utilitzat en la IP com en l'utilitzat en la immunodetecció, i dificultaria la interpretació dels resultats per proximitat entre les dues bandes (50 vs 56 kDa).

En aquest primer experiment vam incloure la variable del temps d'incubació entre l'anticòs i la mostra. Aquesta variable va sorgir perquè en la immunodetecció per WB contra l'LPL, el mètode de referència en el reconeixement 5D2-LPL, es treballa en dos temps i temperatures diferents: a 4°C durant 16h (tota una nit; O/N) o a temperatura ambient durant 2 hores. Com que la IP també és un procés d'immunodetecció, de manera similar al procés del WB, vam incubar la mostra durant aquests dos temps.

També, per tal de mostrejar tots els moments en què podia alliberar-se l'LPL de la mostra, vam recollir diversos volums, ja fos dels diferents no lligats (NL), dels rentats (R) de la columna o dels eluïts (E).

Del primer assaig per IP, vam estudiar els volums on més probablement s'hi podia trobar l'LPL. En el cas de la columna feta sense anticòs 5D2, l'LPL hauria d'aparèixer en la fracció NL per absència d'anticòs que la retingués i, en menor mesura, en els R. En la columna amb anticòs unit covalentment a la proteïna G, s'hauria de detectar l'LPL residualment en el NL o R, però en gran mesura en l'E.

En els resultats (Figura 36), sorprenentment, no vam detectar LPL més enllà dels tres controls: dos de positius d'LPL bovina i un de control d'IP (CI - mostra que conté el mateix volum de reserva d'LPL carregar a cada IP i és el senyal màxim que esperem obtenir de cada IP). En la resta de fraccions, ni es va insinuar la presència d'LPL.

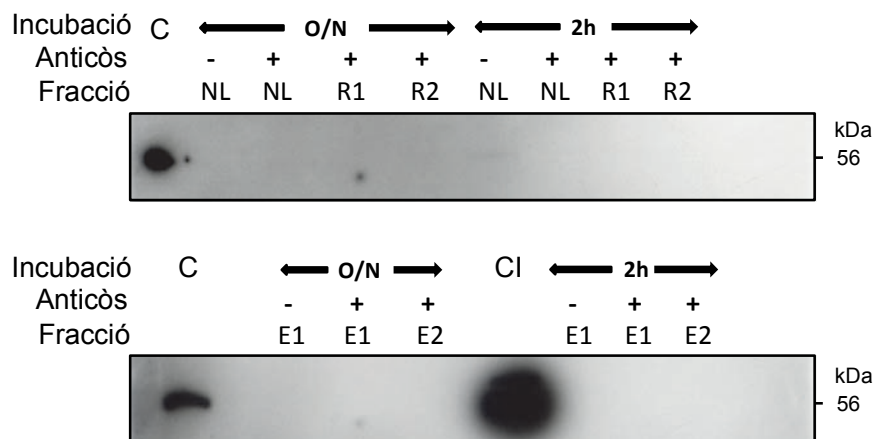


Figura 36. IP1 - 1DE de l'LPL immunoprecipitada en columna d'IP. Anàlisi per WB contra LPL de les diferents etapes de la IP de l'LPL. C, control positiu d'LPL bovina; O/N o 2h, hores d'incubació de la mostra; -/+ absència o presència d'anticòs anti-LPL; NL, no lligat; R, rentat; E, eluït; CI, control de la IP (conté el mateix volum de reserva d'LPL que s'ha utilitzat per a cada IP, ja sigui amb 5D2 o sense). El número que acompanya a "R" i "E" indica l'ordre ordinal de les fraccions obtingudes. kDa assenyalen el pes molecular aparent de l'LPL (56 kDa).

Dues de les possibilitats que explicarien aquesta falta de bandes a les fraccions esperades són:

- 1) Que la mostra no s'hagués unit a l'anticòs 5D2 i hagués quedat en la fracció del NL (tant en presència com en absència d'anticòs, i independentment de la durada de la incubació). El motiu és perquè a l'hora d'analitzar aquestes fraccions (NL o R), només vam fer servir un 10% del volum total (50 µL de 500 µL) per evitar la precipitació de les fraccions. Podria ser que amb aquest petit volum no fos suficient per a la detecció de tota l'LPL, la mateixa que es detecta en la mostra CI.
- 2) Que la mostra s'adherís de forma inespecífica a la matriu de *Sepharose*, proteïna G o altres elements de la IP, i que no es recuperés en els R ni en l'E.

Amb l'objectiu d'avaluar aquestes dues hipòtesis, vam procedir a:

1. Precipitar tot el volum de mostra de les fraccions on possiblement es trobaria LPL.
2. Bullir la columna i la proteïna G que havia estat en contacte amb la mostra durant la incubació.

Els resultats de l'anàlisi dels diferents punts de la IP van mostrar banda de 56 kDa, en menor o major mesura, a tots els punts (Figura 37). La intensitat del senyal va ser força elevat en punts en què la presència d'LPL hauria de ser residual, com per exemple el suport (Co) o els NL en presència d'anticòs (NL +). També va ser sorprenent la presència d'LPL en punts en què no hi hauria d'haver restes de mostra, com per exemple en el suport de la columna (Co) o la matriu de la IP (S+3), tot i ja haver-la eluït dues vegades. Una prova de la retenció de proteïnes per la matriu de *Sepharose* és el resultat de bullir la matriu i revelar-ne el retingut per tint amb plata (S-). En aquest cas, apareix una banda per sobre del marcador de pes molecular de 50 kDa, que representa l'LPL unida inespecíficament, ja que aquesta columna no presenta anticòs.

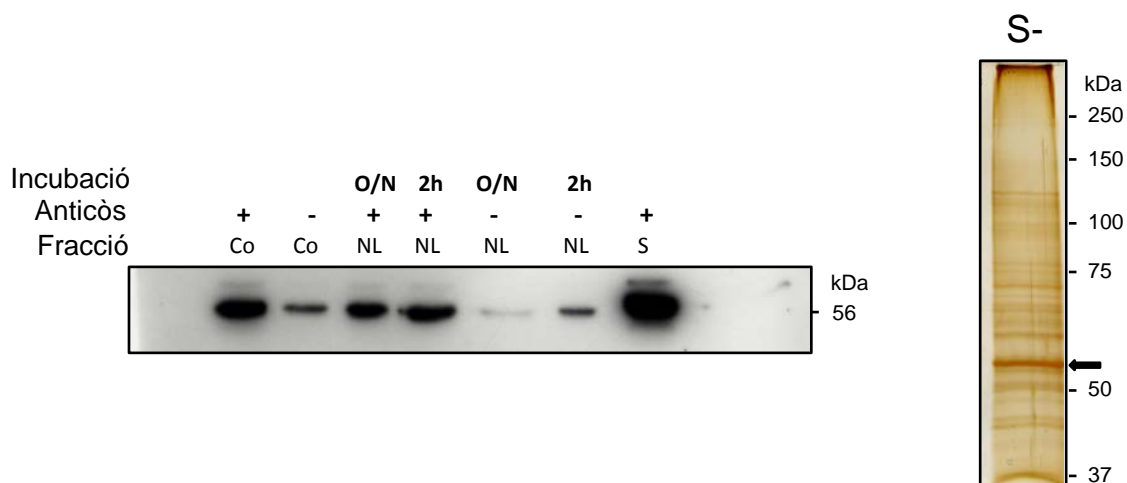


Figura 37. IP1 - 1DE de l'LPL immunoprecipitada en columnes d'IP: punts de retenció de l'LPL. Anàlisi per WB contra l'LPL. O/N o 2h, hores d'incubació de la mostra; +/- absència o presència d'anticòs anti-LPL; "Co", la mostra que queda adherida al plàstic de la columna; NL, no lligat; S, mostra retinguda per la matriu de *Sepharose*. S- és la Ag de tota la proteïna retinguda inespecíficament a la matriu de *Sepharose*. La fletxa assenyalava la proteïna més abundant retinguda a la matriu de *Sepharose*, possiblement LPL. kDa assenyalava el pes molecular aparent i el 56 assenyalava el pes molecular aparent de l'LPL.

Aquests resultats, juntament amb la primera anàlisi feta, van demostrar que la IP feta en columnes no havia funcionat correctament: en tots NL -tant per incubació de 2 hores com per O/N- en presència d'anticòs, va ser significatiu el senyal de l'LPL en el 1DE-WB. Per tant, l'LPL no ha sigut retinguda pel 5D2. Curiosament, en absència d'anticòs, en les mateixes fraccions (NL), el senyal obtingut és molt menor, quan aquí s'hauria de veure pràcticament el 100% de l'LPL carregada a la IP. La gran quantitat d'LPL adherida de forma inespecífica al plàstic de la columna i

a la matriu de *Sepharose* va indicar que o bé el sistema té gran afinitat per les proteïnes o bé l'LPL té gran capacitat d'adherència pel plàstic (pel gran nombre de càrregues presents en la proteïna). Però a l'assaig de Ag de la matriu vam detectar un elevat nombre de proteïnes, no només LPL.

Per tant, sembla que la IP en matriu de *Sepharose* i suport en columna de d'IP no és l'adequat per l'LPL parcialment purificada de TAB de rata.

IP-2: Suport en tub Eppendorf

En veure que l'LPL no semblava eluir correctament en la IP feta en columnes, vam buscar altres procediments d'IP en què pogués funcionar el mètode d'elució de la mostra d'interès.

Per això, el següent assaig es va desenvolupar en microtubs on hi havia la matriu de proteïna G i *Sepharose*, a la qual s'hi afegia l'anticòs i l'LPL. Després de la incubació i diversos rentats, la proteïna s'eluí per ebullició de tota la mostra. En aquest cas, però també s'eluí juntament a l'LPL, l'anticòs 5D2. Aquest punt era molt important a l'hora d'interpretar els resultats del WB per la proximitat, en pes molecular aparent, de les cadenes pesants de l'anticòs i l'LPL.

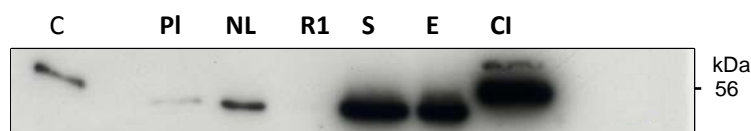


Figura 38. IP2 - 1DE de l'LPL immunoprecipitada en tubs eppendorf. Anàlisi per WB contra LPL de les diferents etapes de la IP de l'LPL. C, control positiu d'LPL bovina; PI, mostra adherida al plàstic; NL, no lligat; R1, primer rentat de la matriu; S, mostra retinguda per la matriu de *Sepharose*; E, eluït; CI, control de la IP i conté el mateix volum de reserva d'LPL que s'ha utilitzat per a cada IP. kDa assenyala el pes molecular aparent de l'LPL (56 kDa).

Els resultats de la Figura 38 van mostrar senyal a diferents punts de la IP tractada amb anticòs. Per començar, el senyal obtingut en el control de la IP (CI) va ser intens, per la qual cosa assegurava la quantitat correcta d'LPL carregada a la IP. Si s'analitzava els resultats seguint els passos de la IP, primer de tot vam intuir senyal d'LPL unit inespecíficament al tub on es va dur a terme l'assaig (PI); també apareixia una petita banda en el NL, d'LPL no unida durant la incubació O/N. Al carril de mostra retinguda per la matriu de *Sepharose* (S), es detectava una banda molt important, tan destacable com la mateixa banda de l'eluït (E). La primera conclusió que vam extraure dels resultats va ser que la IP havia funcionat, encara que fos amb un rendiment relativament baix, ja que es veien bandes de proteïna tant a l'eluït com a d'altres punts.

Però aquesta conclusió va trontollar quan es tingué en compte que en aquesta IP, en l'elució de la mostra també vam obtenir l'anticòs que havia servit per retenir la proteïna objectiu durant els rentats. Si es prenia com a referència l'alçada del CI (ja que el control positiu (C) va sortir corbat per efecte de l'electroforesi) i es traçava una línia a l'alçada de 56 kDa, vam veure clarament que

els senyals obtinguts van quedar per sota d'aquesta línia. Aleshores, els senyals obtinguts en els carrils del NL, S i E no eren LPL sinó l'anticòs 5D2.

Curiosament, mentre que l'anticòs sí que va ser immunoprecipitat per la proteïna G (amb cert rendiment, ja que n'apareix banda al NL i en queda molt unit a la matriu), l'LPL no es va detectar en cap dels punts estudiats: ni al plàstic (PI) ni al NL ni a l'E. Aquests són els punts on més probablement apareixeria l'LPL, funcionés o no la IP.

Com a conclusió d'aquesta IP, l'LPL es va perdre adherida a un punt o pas de la IP, amb gran afinitat i amb més especificitat que no pas pel seu propi anticòs 5D2.

IP-3: Suport en columna de purificació d'IgG

Després dels intents d'IP en columnes i tubs eppendorf, vam passar a l'ús de columnes de purificació d'IgG. Aquesta metodologia ja s'havia desenvolupat anteriorment i amb resultats molt satisfactoris. A més, tant s'havia fet servir per purificar IgG com per eliminar-les de la mostra (sèrum postheparínic humà). A més, aquest segon exemple d'ús demostrava que l'LPL es recuperava i no quedava retenguda a la columna (Badia-Villanueva et al., 2014).

En aquesta metodologia, els diferents tampons (de pas de la mostra, rentat i elució) es recullen en fraccions un cop han passat per la columna. En aquests casos, cal determinar en quina de les fraccions de l'eluit apareixen les proteïnes retengudes per la columna (IgG i altres), ja que les primeres fraccions contindran el volum mort del darrer tampó que s'hagi fet servir. Per això, el primer assaig es va dissenyar amb l'objectiu de descriure el rendiment general de la purificació del 5D2 i, per unió, de l'LPL.

A la imatge dels resultats (Figura 39), vam poder diferenciar, perfectament, el pes molecular de l'LPL i de les bandes pesants de l'anticòs dels controls (C2) tant per WB com per Ag. Però el principal resultat del primer assaig en columna de purificació d'IgG va ser molt positiu per a l'anticòs 5D2 (Figura 39): vam veure clarament les bandes del pes molecular corresponent a les cadenes pesants pels dos sistemes de revelat de resultats. Però en referència a l'LPL, en cap fracció es veuen bandes del pes molecular corresponent a la lipasa. Si bé podia ser que no s'hagués unit a l'anticòs i no hagués quedada retenguda a la columna, aleshores hauria hagut d'aparèixer l'LPL en les fraccions del NL, però ni aleshores va aparèixer.

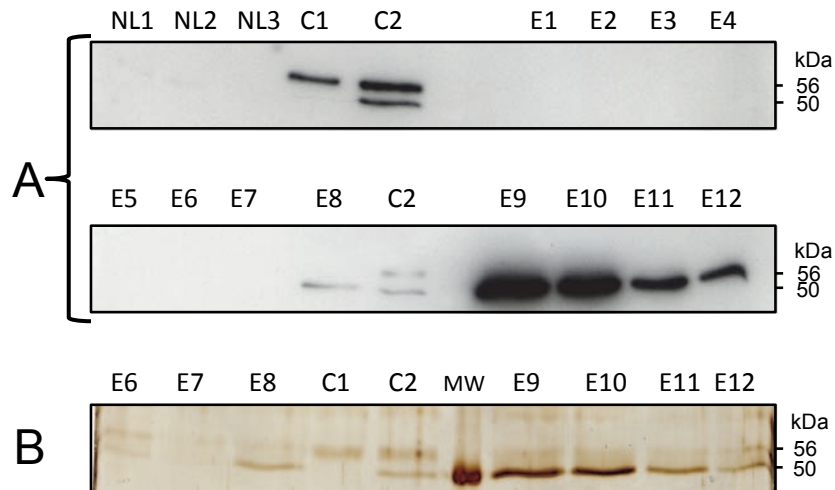


Figura 39. IP3 - 1DE de l'LPL immunoprecipitada en columnes de purificació d'IgG.

Anàlisi per WB contra LPL (A) o per Ag (B) de la IP. NL, no lligat; C1, control d'LPL bovina; C2, control d'LPL bovina i anticòs 5D2; E, eluïts. El número que precedeix les fraccions "NL" i "E" és el número ordinal de la fracció. kDa assenyalen el pes molecular aparent de l'LPL (56 kDa) o de les cadenes pesants de l'anticòs (50 kDa).

Podria ser que la quantitat d'LPL purificada hagués quedat amagada per l'elevada intensitat del senyal de l'anticòs també purificat (Figura 39; "A", carrils "E9", "E10"). A més, en el gel 1DE-Ag (Figura 39 - B) van aparèixer unes bandes lleus, que podrien ser restes d'LPL. Per repetir l'assaig i resoldre amb més definició la IP, vam tornar a immunoprecipitar LPL mitjançant columnes de purificació d'IgG, de la mateixa manera que s'havia fet anteriorment. Però l'eluït de les fraccions on s'esperava l'LPL i el 5D2 -basats en l'experiència prèvia- es va ajuntar en una sola reserva i es va resoldre en 2DE-WB i 2DE-Ag (Figura 40).

Per ajudar a la interpretació dels resultats, vam incloure-hi un parell de controls (Figura 40):

- 1) El primer control (C₁), va ser una mostra de la mateixa reserva d'LPL (purificada parcialment de TAB de rata), la qual es tractaria de la mateixa manera que la mostra pel que fa a precipitacions i incubacions, però sense afegir-hi 5D2 ni passar per la columna. Així es disposaria d'un control de pèrdua d'intensitat o isoformes deguda a la manipulació de la mostra.
- 2) El segon control (C₂), va ser el desenvolupament d'una 2DE-WB de l'anticòs 5D2 únicament. El resultat d'aquest assaig descriuria el patró en 2DE-WB de l'anticòs, que també esperaríem trobar com a resultat de la IP.

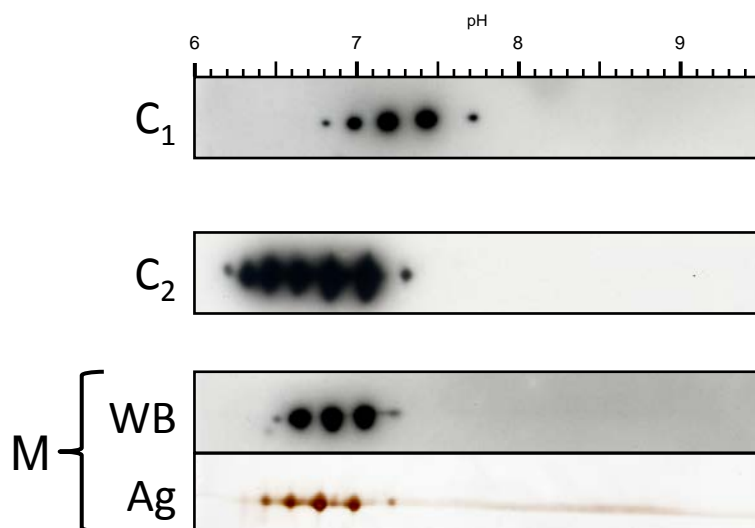


Figura 40. IP3 - 2DE de l'LPL immunoprecipitada en columnes de purificació d'IgG. Mostres enfocades en tires d'IEF de pH 6-11 en 11 cm. (C₁) és el control de manipulació de la mostra, incubada sense l'anticòs ni passada per la columna de purificació; (C₂) és la 2DE per WB de l'anticòs anti-LPL (5D2). Tots dos controls analitzats per WB. M, resultats de la mostra immunoprecipitada, analitzats per WB i Ag. Valors de pH de la tira d'IEF a la part superior de la imatge.

En prendre el resultat de la 2DE del control de manipulació de mostra (Figura 40 - C₁), vam detectar encara isoformes d'LPL, tot i que el nombre era menor al descrit al patró de TAB de rata adulta (Figura 16). Aquesta reducció del nombre d'isoformes i de la intensitat, segurament va ser deguda a la manipulació de la mostra. Fent atenció en la 2DE-WB de l'anticòs 5D2 (Figura 40 - C₂), primer de tot sobta el fet que les cadenes pesants tenen isoformes de pI, també en un interval de pH entre 6 i 9. Això, juntament al fet que l'anticòs secundari les reconeix i que el pes molecular aparent és molt proper al pes molecular de l'LPL, podia dificultar la correcta interpretació dels resultats obtinguts, fins i tot, en els futurs assajos de 2DE.

Els resultats de la 2DE de la mostra immunoprecipitada, tant per WB com per Ag, van mostrar una sèrie de taques de pes molecular proper als 50 kDa i d'un interval de pH de 6,5-7,3 (Figura 40). Pels resultats del control d'anticòs 5D2 (C₂), sabem que l'anticòs també té isoformes i tant per pes molecular aparent com per pI, molt similars a les isoformes de l'LPL. La millor manera de concloure quina proteïna era la que s'havia immunoprecipitat va ser per comparació dels pI d'isoformes obtinguts respecte els diferents controls (la mostra sense IP i l'anticòs 5D2), en les imatges obtingudes per WB (Figura 41).

La conclusió d'alinear les tres imatges de les 2DE-WB va ser que la mostra tractada en IP i enfocada en 2DE únicament inclou l'anticòs 5D2 i no es detecta la presència d'LPL. Tot i que la isoforma més bàsica de la mostra (M) no es correspon amb cap de les isoformes de l'anticòs (C₂) o l'LPL (C₁), les altres es corresponen perfectament amb el patró de les isoformes del 5D2.

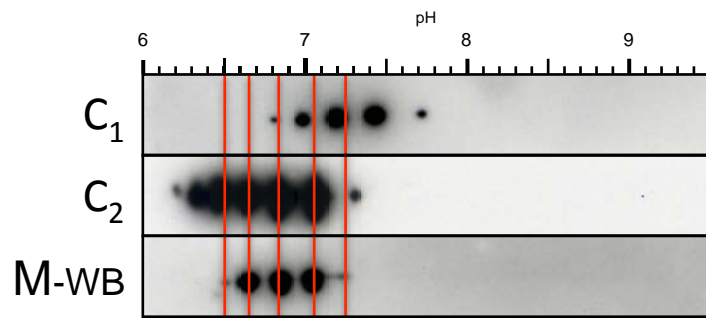


Figura 41. IP3 - Alineament de les isoformes de l'LPL immunoprecipitada en columnes de purificació d'IgG. Les línies vermelles s'originen del patró de la mostra (M) immunoprecipitada en l'IP3. (C₁) control de manipulació de la mostra sense IP i (C₂) 2DE de l'anticòs anti-LPL. Valors de pH de la tira d'IEF a la part superior de la imatge.

Si l'LPL no va ser detectada ni en el volum de mostra no lligada a la columna ni en l'eluit, podria ser que la proteïna s'unís inespecíficament i molt fort al suport físic de la columna d'IP. Aquesta hipòtesi es basa en l'experiència prèvia de la IP1. En aquell cas, gran part de la mostra quedava retinguda per la matriu de *Sepharose* i en el plàstic de la columna (Figura 37).

Per altra banda, aquest tipus d'assaig ja s'havia fet servir per eliminar IgG del plasma postheparínic humà (Badia-Villanueva et al., 2014) i en la mostra, encara es va detectar LPL. Aquesta diferència de resultats obtinguts entre el plasma humà i el TAB de rata podria ser deguda a la diferència de concentració i composició de proteïnes de cada mostra que es va passar per la columna de proteïna G. Part d'aquestes proteïnes acompanyants del plasma humà podrien evitar la retenció inespecífica de l'LPL, ja sigui perquè ho impediessin o perquè aquestes altres proteïnes quedessin retingudes en lloc de l'LPL. Com que no volíem afegir més proteïnes a la mostra amb LPL, el que vam fer va ser passar també amb albúmina per la columna, a fi de saturar els possibles llocs de retenció de proteïnes.

La *Sepharose* utilitzada com a matriu de les columnes de purificació d'IgG és la mateixa que es fa servir per a la matriu de les columnes de purificació parcial de l'LPL. Com que en les columnes de purificació l'LPL és recuperada, vam plantejar la possibilitat d'eluir l'LPL de les columnes de purificació d'IgG mitjançant una solució d'elevada força iònica (NaCl), de la mateixa manera que fem en les purificacions parcials d'LPL per cromatografia d'afinitat.

Els resultats de l'anàlisi 1DE-WB de les diferents fraccions analitzades de les diferents IP van donar una valuosa informació sobre el funcionament i la interacció de l'LPL amb la columna de purificació d'anticòs (Figura 42).

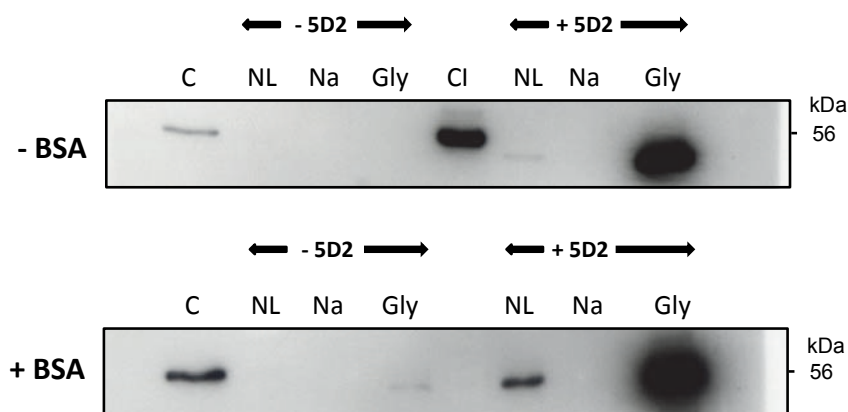


Figura 42. IP3 – 1DE de l'LPL immunoprecipitada en columnes de purificació d'IgG: saturació de la columna. Pas d'albumina per la columna abans de passar la mostra amb l'LPL. BSA, albúmina sèrica bovina; -/+ absència o presència d'anticòs anti-LPL o BSA; C+, control positiu d'LPL bovina; NL, no lligat; Na, elució per força iònica; Gly, elució per pH àcid; CI, control de la IP (conté el mateix volum de reserva d'LPL que s'ha utilitzat per a cada IP, ja sigui amb 5D2 o sense). kDa assenyalava el pes molecular aparent de l'LPL (56 kDa).

Pel que fa a les columnes sense saturar amb BSA (**-BSA**), vam detectar l'LPL del control d'immunoprecipitació (CI) amb un senyal ben intens; aquesta era, aproximadament, la intensitat que s'esperava aconseguir en la IP. Curiosament, el senyal del control positiu d'LPL bovina (C) es va detectar molt suaument; tanmateix, no se li va donar més importància perquè altres bandes de mateix pes molecular aparent havien estat immunodetectades perfectament en el mateix assaig. En la columna sense anticòs anti-LPL, no es va detectar cap banda ni al NL ni en cap de les dues elucions. Per altra banda, en la columna amb anticòs 5D2, van aparèixer dues bandes: la primera, d'intensitat molt lleu, en el NL i la segona en l'elució per pH ("Gly"). Lamentablement, totes dues bandes van ser detectades a una alçada de pes molecular aparent inferior al de l'LPL. Els resultats d'aquest assaig, sense bloquejar la columna, van ser coherents amb els obtinguts anteriorment (Figura 39, Figura 40) perquè l'LPL no es va detectar en cap de les fraccions on podria ser: en la columna sense anticòs s'hauria de localitzar en el NL, mentre que en l'altra columna s'hauria de veure en algun dels dos eluïts: per força iònica ("Na") o per àcid ("Gly").

A les columnes saturades amb BSA (**+BSA**) prèviament al pas de la mostra, vam detectar perfectament el control d'LPL bovina. Però en la columna tractada sense anticòs anti-LPL, no vam visualitzar cap banda d'LPL, especialment on s'esperava: en el NL. Quan la mostra va ser tractada amb l'anticòs específic, en la imatge obtinguda per WB contra LPL van aparèixer, de nou, dues bandes: en el NL i en l'eluït amb Gly. Aquestes bandes, novament, van ser d'un pes molecular aparent més proper al de les cadenes pesants de l'anticòs que no pas a la mateixa LPL. L'LPL, en l'assaig amb saturació per BSA, tampoc no es recuperava del pas a través de la columna.

Pels resultats obtinguts, la hipòtesi que les unions o el fet que segrestés l'LPL podien ser bloquejats de forma inespecífica amb qualsevol altra proteïna va quedar clarament desmentida pels resultats de la Figura 42. Per tant, la columna de purificació d'IgG tampoc ens serveix per a la IP de l'LPL provinent de la purificació parcial per heparina-*Sepharose*.

5.5.3. Immunoprecipitació en matriu metàl·lica

IP-4: Suport en tub Eppendorf

Després de concloure que els suports de les IP precedents retenien de forma inespecífica i forta l'LPL, vam buscar un assaig en què la matriu fos mínima a fi de reduir les possibles interaccions amb la proteïna. Per això, vam treballar amb una matriu metàl·lica i que no impliqués altres estructures (p.e. proteïna G) on també podria unir-se l'LPL. En aquestes IP, la unió de l'anticòs a la matriu és inespecífica i no sempre queda orientat correctament. Per altra banda, aquesta metodologia uneix covalentment l'anticòs a la matriu i, d'aquesta manera, en l'elutit és present la proteïna objectiu de la immunoprecipitació però no l'anticòs.

Dels resultats de la immunoprecipitació (Figura 43), en vam analitzar diverses fraccions, tant de la columna amb anticòs 5D2 com sense. L'assaig 1DE-WB va funcionar correctament, ja que vam poder detectar el senyal del C; també, la mostra carregada a cada IP es va veure reflectida en el control CI.

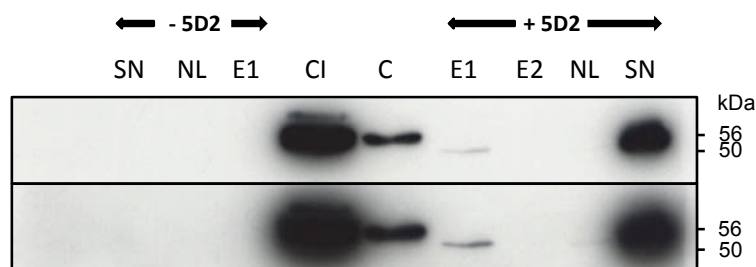


Figura 43. IP4 - 1DE de l'LPL immunoprecipitada en suport magnètic. Anàlisi de les fraccions de la IP per WB contra LPL. -/+ absència o presència d'anticòs 5D2 en la IP; C, control positiu d'LPL bovina; NL, no lligat; SN, sobrenedant de la incubació de l'anticòs amb la matriu magnètica; E, eluït en 50 μ L (E1) o en 100 μ L (E2); CI, control de la IP (conté el mateix volum de reserva d'LPL que s'ha utilitzat per a cada IP, ja sigui amb 5D2 o sense). Les dues imatges corresponen al mateix film, però en dues exposicions diferents. kDa assenyalen el pes molecular aparent de l'LPL (56 kDa) o de les cadenes pesants de l'anticòs (50 kDa).

Fent l'anàlisi per ordre cronològic de la IP, podem destacar:

- Primer, en el sobrenedant (**SN**) de la unió entre l'anticòs 5D2 i la matriu es detecta una gran quantitat de mostra en la columna "+5D2", mentre que la columna "-5D2" no es detecta gens d'anticòs. Aquest senyal és l'anticòs que no ha quedat unit a la matriu, el qual també ens serveix com a control de pes molecular aparent de les cadenes pesants de l'anticòs dels següents passos de la IP.

- Després de la incubació de la mostra amb les boles magnètiques recobertes d'anticòs, vam analitzar el volum del **NL** i no va aparèixer cap banda en cap dels casos, amb anticòs o sense, quan era esperable en aquesta fracció l'aparició de tota l'LPL que no hagués quedat retinguda per l'anticòs. Així, mentre que a la columna tractada amb anticòs era una bona notícia perquè significa que no ha quedat LPL lliure, per la columna sense 5D2 era un mal presagi perquè aquí era on, precisament, hauria d'aparèixer un senyal similar a la banda del CI. En conseqüència, els resultats obtinguts en la IP serien incoherents.
- Finalment, en els carrils dels eluïts (**E**) només va aparèixer una petita banda en l'E1 de la columna tractada amb anticòs. Tot i que aquest era el resultat desitjat, en estudiar més detingudament el resultat, vam detectar que la banda era, de nou, d'un pes molecular aparent inferior al de l'LPL. En prendre com a referència el senyal del carril SN, es veu clarament com aquest senyal obtingut tornava a correspondre a les cadenes pesants del 5D2.

Els resultats obtinguts de la IP magnètica van ser força descoratjadors i inesperats, en diversos aspectes. No només per no haver aconseguit immunoprecipitar l'LPL, sinó sobretot perquè vam perdre la mostra durant la manipulació de l'LPL juntament amb la matriu de la IP. A l'assaig, la quantitat d'LPL que inicia la IP (**CI**) en la incubació sense anticòs hauria d'aparèixer a la fracció del NL. Tanmateix, aquesta banda no és present en absolut. No podem dir que la mostra hagi quedat unida al microtub o al plàstic, ja que el CI també ha estat incubat en les mateixes circumstàncies i, en aquest cas, la banda d'LPL és ben present.

A més, el fet que aparegui encara senyal de l'anticòs en l'eluit (E) de la columna "+5D2" després d'haver-la rentat diverses vegades, denota que la unió de l'anticòs de forma directa amb la matriu té alguns punts febles. Possiblement, sigui degut a la unió no dirigida de les IgG amb la matriu, que en lligar covalentment les cadenes a la matriu, algunes de les pesants no s'uneixin. Aquestes quedarien a l'abast de l'elució i es recuperarien en revelar per WB.

Així, com a conclusió de la IP magnètica, podem dir que amb aquest sistema tampoc ha estat possible immunoprecipitar LPL. L'origen de l'impediment no sembla estar relacionat amb la relació antígen-anticòs, ja que en les columnes sense anticòs, el comportament de la mostra tampoc és l'esperat. Com en les anteriors IP, alguna de les parts que conformen el procés, sembla segrestar fortament l'LPL present a la mostra.

Tanmateix, aquesta hipòtesi és difícil d'acceptar perquè els elements que conformen la IP han estat considerablement reduïts per evitar unions inespecífiques, s'inclouen passos per saturar qualsevol reacció que pogués segrestar la proteïna i s'eliminen tots els sobrants mitjançant rentats de la matriu. Per tots aquests motius, l'LPL hauria d'aparèixer, com a mínim en el primer no lligat (NL) de qualsevol IP, tant si fos reconeguda i retinguda per l'anticòs com si no.

5.5.4. Conclusions de la immunoprecipitació de l'LPL de fetge

De les quatre metodologies d'immunoprecipitació que hem emprat, cap ha assolit uns resultats clars: en la majoria de casos, l'LPL no es va trobar present en els punts en què s'esperaria; en d'altres, simplement va semblar que era retinguda pel sistema [matriu-proteïna G-plàstic]. Per ser més precisos, en la **IP-1**, l'LPL no només no va eluir en el moment indicat, sinó que es va parcialment recuperar adherida a diversos elements (*Sepharose*, plàstic,...). En la **IP-2** i **IP-3**, de nou, l'únic senyal que vam veure va ser el de l'anticòs en l'eluït, mentre que l'LPL semblava perduda. Finalment, en la **IP-4** tot i treballar amb una matriu inactivada durant el procés i d'unió directa de l'anticòs a la matriu, tampoc vam obtenir resultats coherents i, una altra vegada, l'LPL va semblar quedar retinguda o perduda per la matriu/sistema de la IP.

Hagués estat un bon control metodològic de la IP haver fet la IP d'una altra proteïna. Però tampoc hagués garantit que el treball fet en paral·lel amb 5D2 i LPL funcionés correctament. Abans de buscar justificacions de per què no va funcionar la interacció antigen-anticòs de la IP, hem de començar l'anàlisi en les columnes negatives (columnes sense anticòs), en les quals el comportament de l'LPL tampoc va ser lògic: l'LPL no apareixia en les fraccions del no lligat (NL) ni en les primeres fraccions dels rentats (R). Tanmateix, les metodologies van ser consultades i debatudes amb persones amb una àmplia experiència en aquesta tècnica. Per exemple, de les columnes per a la purificació d'IgG ja en teníem experiències prèvies, en què en la fase no lligada de la columna es recuperava l'LPL (Badia-Villanueva et al., 2014), la qual va ser identificada per espectrometria de masses.

Així, sembla que l'LPL és una proteïna que, per les seves característiques, és difícil d'aplicar-hi els mètodes actuals d'IP. Possiblement la seva estructura i elevat nombre de càrregues positives a la seqüència reaccionen amb altres elements, els quals presenten major afinitat que el seu anticòs, que la retenen fortament i eviten l'elució per àcid o elevada força iònica.

A partir d'aleshores, el plantejament era determinar si la feina que implicaria la posada al punt de la IP de l'LPL compensava el resultat que se n'esperava obtenir mercès a aquesta tècnica. En principi, la IP només ens serviria per a una segona purificació de l'LPL del fetge de cria de rata, ja que per als altres teixits la proteïna s'havia pogut resoldre en 2DE sense cap inconvenient. En base a les perspectives de profit i al temps dedicat fins aleshores, vam decidir no seguir endavant amb aquesta posada al punt.

Com a conseqüència de deixar a banda la IP de l'LPL de fetge de cria de rata, no vam poder determinar de forma definitiva si la reserva de l'LPL parcialment purificada d'aquest teixit (Figura 32) era un conjunt d'isoformes de pI i, en cas afirmatiu, les característiques d'aquestes isoformes (nombre, pI i abundància relativa).

5.6. Discussió: teixits de cria de rata

Dels teixits de cria de rata, hem purificat parcialment i detectat per primera vegada l'LPL de cor, TAM i fetge. A diferència de la rata adulta, l'LPL del fetge de cria de

rata ha estat possible immunodetectar-la. La diferència entre tots dos moments de l'animal que afavoreix aquesta detecció rau en què el fetge de cria expressa LPL pròpia (Burgaya et al., 1989; Vilaro et al., 1988b), a diferència de l'adult, que la poca activitat que presenta és originària d'altres teixits.

Per a cor i TAM, hem descrit el patró de les isoformes de pl de l'LPL, els quals no comparteixen la mateixa distribució de pl entre tots dos teixits. Aquest comportament entre cor i TAM ja el vam descriure en el treball en teixits adults (Figura 18). Per altra banda, hem descrit que els teixits d'adult mantenen els mateixos patrons de pl de les isoformes que ja presenten les cries. Així, durant el creixement dels animals, possiblement els pl de les isoformes d'un teixit es mantinguin constants, sempre en una situació d'estabulació control. Aquests resultats divergeixen amb els obtinguts en llavors de plantes (Finnie, 2005), les quals presenten diferents isoformes durant la germinació de les llavors. A banda de divergències evidents entre teixits de rata i llavors de planta, aquest comportament temporal diferent pot ser degut a que la funció principal del cor i del TAM durant el creixement dels animals no varia, mentre que en el desenvolupament de les llavors és necessari variar l'expressió de certes isoformes a fi de respondre a les diferents necessitats durant el creixement de la plàntula.

Així com en el cas del cor l'abundància relativa entre el patró d'adult i de cria varia força, en el TAM es manté molt constant entre tots dos moments de la vida dels animals. Pels resultats obtinguts en cor, el tipus de dieta podria ser un factor que determinés, parcialment, les abundàncies relatives de cada isoforma. Aquesta hipòtesi es basa en el fet que la cria de rata de 15 dies de vida encara s'alimenta únicament de llet materna, la qual és rica en lípids (Keen et al., 1981; Nicholas and Hartmann, 1991), i per tant, l'entrada d'aquest tipus de nutrient per la dieta és major que en adult, el qual s'alimenta únicament de pinso, més ric en hidrats de carboni. El cor podria ser més sensible a les diferents proporcions de nutrients i a les característiques dels lípids d'origen extern i adaptar les abundàncies relatives de cada isoforma en funció de l'alimentació. Perquè aquesta hipòtesi sigui certa, caldria demostrar que les isoformes de pl de l'LPL tenen diferent afinitat pel substrat. Aquest canvi d'abundàncies no s'escau al TAM perquè és un teixit menys sensible a les variacions (tant per tipus com per concentració) de lípids en sang.

En el cas del fetge, malgrat haver detectat l'LPL en l'anàlisi de la purificació parcial (Figura 30), no ha estat possible descriure el patró de les isoformes de l'LPL. Aquest fet sembla ser per culpa de problemes metodològics en l'IEF de les mostres, tal i com s'ha reflectit en el desenvolupament d'aquestes tècniques. La IP de l'LPL, que es va plantejar per resoldre els obstacles de l'IEF, ha resultat inviable per característiques físico-químiques de l'LPL en la seva immunoprecipitació.

De la mateixa manera que ha passar en la descripció de les isoformes en teixits de rata adulta, en aquest cas també manquen exemples de recerca orientada en la descripció de patrons d'isoformes en diferents teixits o moments del desenvolupament dels animals. Únicament, el treball de C. Finnie (2005) descriu la transició d'isoformes de certes proteïnes durant la germinació de certes llavors (Finnie, 2005).

6. Patró d'isoformes de pl de l'LPL en teixits de macaco de Java

6.1. Activitat LPL en teixits de macaco

De tots els teixits obtinguts de cada animal, vam quantificar l'activitat LPL a partir de les mostres que vam extreure en el moment del sacrifici: cor, múscul i diafragma, fetge i sèrum, diversos tipus de TAB i TAM. Tal i com s'explica a l'apartat de material i mètodes 1.3. Valoració de l'activitat lipoproteïna lipasa (PNT 0350600 EXP/013), tant l'activitat del fetge com del plasma es va preincubar amb anticòs anti-lipasa hepàtica. També vam quantificar les mostres de diafragma, que actuarien com a controls, per determinar la caiguda d'activitat per la manipulació de l'animal durant l'extracció de teixits.

El primer resultat a comentar respecte les activitats en els teixits de macaco és l'activitat en diafragma durant la manipulació i extracció (Taula 3). Aquest control no s'havia aplicat anteriorment amb les mostres de rata perquè, en aquest animal, l'extracció de teixits ja estava optimitzada per al manteniment de l'activitat LPL en els teixits. Aquest control no el vam poder seguir amb tots els animals dels quals vam obtenir mostres, ja que fins que no vam assistir al procediment d'extracció de teixits no vam poder-nos adaptar al protocol de BioSystems.

Tal i com es pot veure a la Taula 3 els valors d'activitat al final de l'extracció dels teixits (D3) en comparació a l'inici (D1) del sacrifici no es van veure reduïts. Per tant, el temps d'extracció de tots els teixits no va afectar a la mostra de diafragma extreta al final del sacrifici. Així, els valors que s'obtinguessin de la resta de teixits es podrien considerar el 100% de l'activitat específica del teixit en el moment de mort de l'animal.

Activitat LPL (mU/mL) en diafragma			
Codi animal	D1	D3	D1-D3
570	4,48	3,69	0,79
571	3,23	3,24	-0,01
572	2,99	4,96	-1,97
573	2,37	3,14	-0,77
575	4,68	5,54	-0,86
576	2,75	4,04	-1,29
577	1,63	3,95	-2,32

Taula 3. Activitat LPL en diafragma de macaco. Valoració de mostres de diafragma extretes a l'inici (D1) i al final (D3) del procés de sacrifici dels animals.

Els resultats de la valoració d'activitat LPL (Figura 44) dels diferents teixits del macaco van mostrar una elevada dispersió de resultats, la qual va ser deguda a

l'elevada diferència entre els animals estudiats. Aquesta dispersió entre individus no és sorprenent a causa de les diverses variables que no es van poder controlar: situació fisiològica, estrès, etc.

Segons la magnitud del valor d'activitat obtingut, vam trobar teixits amb major activitat, que va incloure únicament el TAM amb 600 mU/g de teixit, un grup intermedi més nombrós amb tots els TAB i el cor, d'entre 100 i 200 mU/g de teixit; i finalment, els teixits amb menor activitat LPL: múscul, diafragma, fetge i sèrum.

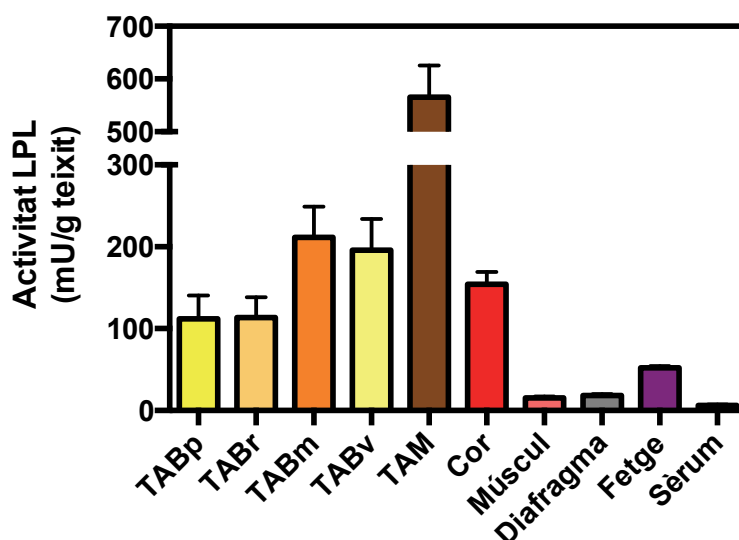


Figura 44. Activitat LPL en teixits de macaco. Resultats expressats segons la mitjana \pm error estàndard dels diferents animals estudiats ($n=13$). Teixits adiposos blancs perigonadal (TABp), retroperitoneal (TABr), mesentèric (TABm) i visceral (TABv).

6.2. Purificació parcial de l'LPL de teixit adipós blanc de macaco

Un cop descrita l'activitat LPL en els diferents teixits, vam plantejar la descripció de la distribució de les isoformes de pl de l'LPL de macaco. El primer pas va ser decidir de quin teixit s'iniciava la purificació parcial en cromatografia d'afinitat, ja que no serviria de res purificar l'LPL de tots els teixits si posteriorment no era reconeguda per l'anticòs anit-LPL, el 5D2. Vam partir de l'experiència del nostre grup (Badia-Villanueva, 2018; Casanovas, 2009) en purificacions de teixits humans i de rata per anar descartant les diferents opcions: per començar, dels diferents tipus de teixits, vam escollir un teixit adipós blanc. Aquest tipus de teixit tenia valors d'activitat LPL prou elevats i la complexitat proteica de la reserva obtinguda acostumava a ser força reduïda. Aquest segon factor permet augmentar el volum de mostra utilitzada en els posteriors assajos (2DE), sense comprometre el correcte desenvolupament del mètode. Però de macaco vam obtenir fins a quatre teixits adiposos diferents: perigonadal, retroperitoneal, mesentèric i visceral. Segons els resultats de la Figura 44, tots quatre teixits van obtenir valors d'activitat entre 100 i 200 mU/g de teixit. Així que aquest no semblava un factor que decidís clarament quin teixit utilitzar, ni descartar-ne cap. Per tant ens vam centrar en la disponibilitat d'LPL segons cada teixit, en base a la massa total de cada teixit per individu.

A la Taula 4 vam descriure l'activitat lipasa a cada TAB, tant de rata com de macaco, i la seva activitat total per individu. El cas del TAB visceral, només apareix en macaco perquè en rata és pràcticament inexistent. L'activitat total del mesentèric de macaco no es va calcular ja que no vam poder extraure tot el teixit durant els sacrificis, únicament una mostra per mesurar-ne l'activitat. Així doncs, els valors obtinguts en l'activitat enzimàtica van ser molt similars als teixits de rata dels quals se n'havia purificat l'LPL anteriorment. Així s'esperava que, en treballar amb les mateixes quantitats de teixit, s'obtidria uns resultats similars pel que fa a quantitat de proteïna LPL en rata.

Teixit	Rata		Macaco		
	TAB	mU/g tx	mU totals	mU/g tx	mU totals
perigonadal		133 ± 26	227 ± 50	112 ± 29	240
retroperitoneal		67 ± 5	302 ± 19	113 ± 25	385
mesentèric		122 ± 5	228 ± 34	211 ± 38	-
visceral		-	-	195 ± 38	6487

Taula 4. Activitats lipasa en TAB de rata i macaco. Resultats expressats segons la mitjana ± error estàndard dels diferents animals estudiats (en macaco, n=13). Valors de rata extrets de Ricart-Jane (2003).

Finalment, vam decidir treballar amb el TAB visceral perquè:

- 1) presentava elevada activitat lipasa per gram de teixit.
- 2) era el teixit amb major massa per individu.
- 3) era de fàcil extracció.

En la purificació parcial de l'LPL del TAB visceral de macaco (Figura 45), vam obtenir valors de proteïna total molt baixos durant el pas de la mostra i en l'eluït no es va arribar a detectar proteïna. Pel que fa a activitat LPL, únicament vam detectar un pic en l'eluït. El perfil d'aquesta purificació es va comportar de manera similar a la purificació del TAB epididimal de rata (Figura 12), tal i com esperàvem. La principal diferència (valor d'activitat en el pic de l'eluït) va ser deguda a la quantitat de mostra de què es va partir, molt major en rata que en macaco.

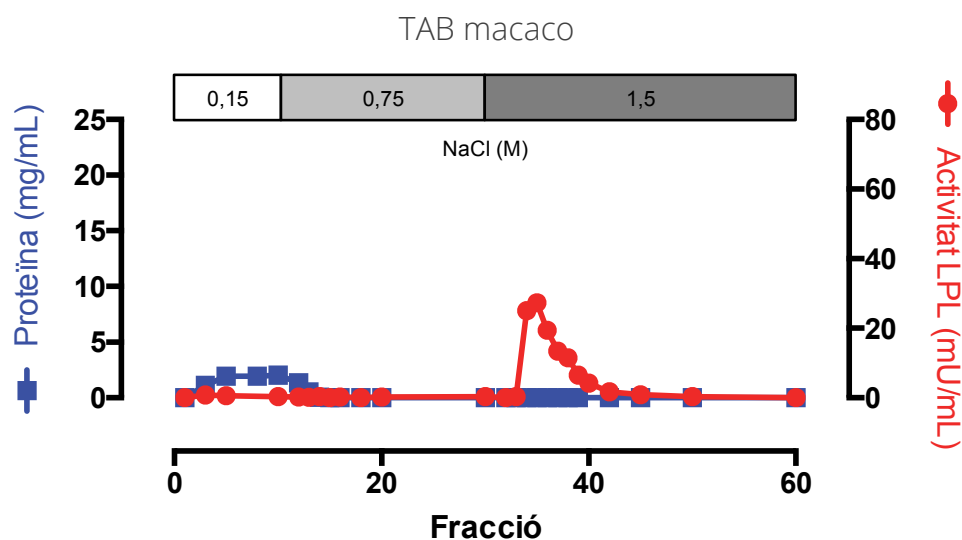


Figura 45. Purificació parcial de l'LPL per cromatografia d'afinitat de TAB visceral de macaco. De cada fracció escollida, vam quantificar la proteïna total (quadrats blaus) i l'activitat LPL (cercles vermells) en diferents moments d'un gradient creixent de NaCl (eix superior, en gris). Teixit procedent de 13 animals.

A partir d'aquesta purificació del TAB de macaco, tal i com s'havia fet anteriorment, vam descriure el procés de purificació parcial mitjançant una 1DE seguida de WB de l'LPL i Ag de totes les proteïnes (Figura 46). D'aquest assaig, el resultat del Ag va revelar que la complexitat de la reserva va ser força reduïda: es van veure poques bandes i no molt intenses. L'altre assaig que vam fer, la immunodetecció de l'LPL, també va ser molt satisfactori, ja que va aparèixer una banda molt intensa a l'alçada corresponent al pes molecular aparent de l'LPL. Aquesta mateixa banda s'identificava en el gel tenyit amb plata. No es va identificar per mapatge peptídic (PMF) si la banda detectada per WB era LPL ja que, segons Chang, l'anticòs reconeix únicament l'LPL i no altres lipases; a més, està descrit que l'anticòs és capaç de reconèixer de diverses espècies l'LPL (Chang et al., 1998).

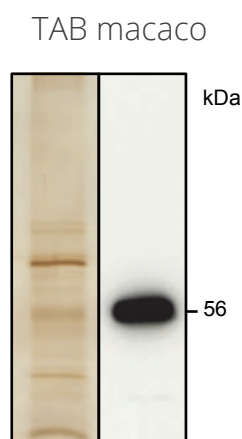


Figura 46. 1DE de la purificació parcial de l'LPL de TAB visceral de macaco. Imatges obtingudes mitjançant Ag (imatge de l'esquerra) i WB contra LPL (imatge de la dreta). Resum de l'anàlisi feta com es descriu a la **Figura 13**. kDa assenyalada el pes molecular aparent de l'LPL (56 kDa).

Per tant, la previsió de treballar amb aquest teixit (un adipós blanc) per evitar alta complexitat proteica a la mostra, va ser correcta. Les conclusions de la purificació parcial de l'LPL de TAB visceral de macaco són que podem purificar-ne l'LPL de la mateixa manera que en teixits de rata i que aquesta LPL es pot detectar mitjançant l'anticòs específic d'LPL, el 5D2.

6.3. Anàlisi per 2DE de l'LPL de macaco

Ja s'havia demostrat que es podia identificar per WB l'LPL de la reserva de TAB visceral (Figura 46), però calia determinar si aquesta espècie també presentava isoformes de pI de l'LPL i en quin interval de pH es distribuïen.

Com a espècie nova i sense tenir-ne experiències prèvies, ens vam plantejar quin havia de ser l'interval de pH per començar la descripció. De manera general, sempre s'inicia amb un interval ampli per assegurar visualitzar les isoformes de pI, per exemple un interval de pH 3 a 10. A continuació, s'amplia l'interval, si és possible, on han aparegut les isoformes de pI. Tanmateix, en tots els teixits fets fins aleshores (tant d'aquest treball com d'altres del grup de recerca: rata i humana (Badia-Villanueva et al., 2014), les isoformes van presentar un interval de distribució de pH entre 6,5 i 8,5. Així doncs, en base a aquesta experiència, vam iniciar la descripció en l'interval habitual de treball, més estret i conegut: pH de 6 a 11 (Figura 47).

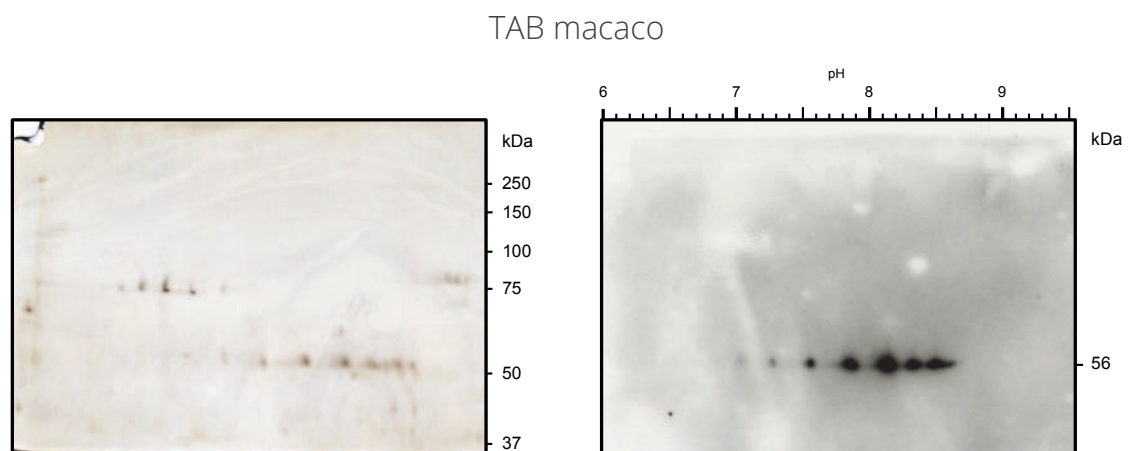


Figura 47. 2DE de la reserva d'LPL de TAB visceral de macaco. Enfocament en tires d'IEF d'11cm de pH 6-11, resoltes per Ag (imatge de l'esquerra) o WB (imatge de la dreta). Es van carregar fins a 300 µg de proteïna total per assaig. Es va mantenir la traçabilitat del pH (escala superior a la imatge del WB) tal i com es descriu en l'apartat de materials i mètodes (4.1. Creació del patró d'isoformes de pI de l'LPL). kDa és el marcador de pes molecular aparent i el 56 assenyalava el pes molecular aparent de l'LPL.

Els resultats de l'IEF de la mostra tenyida amb plata van donar molta informació: primerament, que l'assaig 2DE havia funcionat correctament, ja que els punts de proteïnes es veien correctament enfocats. A més, es va tenyir poca proteïna (la complexitat de la reserva es confirma que era molt baixa i en cas de no aparèixer LPL immunodetectada, seria problema del WB i no de l'enfocament). En la mostra

dedicada al WB, el resultat va ser positiu, ja que van aparèixer fins a 8 isoformes de pI de l'LPL, detectades en un interval aproximat de pH de 7 a 8,8. També cal destacar la netedat dels films obtinguts, que confirma l'alta especificitat de l'anticòs.

6.4. Patró d'isoformes de pI de l'LPL

Una vegada descrita la presència d'isoformes en el teixit de macaco amb què vam treballar, vam repetir la 2DE-WB a partir de la reserva de la purificació parcial, per tal de descriure el patró a partir dels pI i els percentatges relatius de distribució de les isoformes de l'LPL.

A la Figura 48, cada isoforma de l'LPL ve determinada pel seu punt isoelèctric (eix horitzontal) i pel seu percentatge d'abundància relativa (àrea del cercle respecte el total de la superfície de les esferes d'un mateix teixit). Així, el pI de qualsevol isoforma es pot comparar amb el de qualsevol altre patró, de tots els teixits. Malauradament, en aquesta representació, les abundàncies relatives només poden comparar-se entre isoformes del mateix teixit. Aquesta diferència entre el pI i l'abundància relativa és deguda al sistema de descripció del patró.

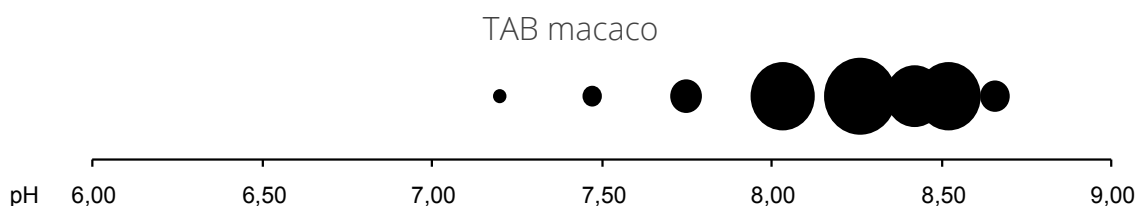


Figura 48. Patró d'isoformes de pI de l'LPL de TAB visceral de macaco. Representació del patró d'isoformes de pI de l'LPL segons els pI (eix horitzontal) i les abundàncies relatives (àrea de cada taca). Resultats obtinguts dels diferents WB en 2DE (n=2).

A partir del patró de les isoformes de pI de l'LPL es va concloure la composició i distribució en aquest teixit de macaco. Així, el **TAB** visceral té fins a 8 isoformes, les quals es distribueixen entre un pH de 7,20 i 8,66. Les isoformes majoritàries es concentren als pH més bàsics, les quals acumulen entre cinc més del 92% total del teixit.

6.5. Discussió: teixits de macaco

Els valors obtinguts d'activitat LPL en plasma són extraordinàriament baixos comparats amb altres referències també de plasma de macaco (Goldberg et al., 1983; Sharma et al., 1986), ja que en aquells treballs es va valorar l'activitat en plasmes postheparínics, els quals contenen l'enzim alliberat per l'heparina, mentre que en el nostre cas, era un plasma procedent d'animals sense tractament amb heparina. No vam aplicar aquest tractament amb heparina per dos motius:

- El primer motiu és que no se sap com afecta el tractament amb heparina a les isoformes de pI de l'LPL del teixit; i vam prioritzar els diferents teixits i en contra de l'LPL del plasma postheparínic.

- El segon –i principal- motiu és que aquests animals van ser aprofitats d'un altre procediment, el qual no permetia incloure una injecció d'heparina prèvia al sacrifici dels animals.

La magnitud dels resultats d'activitat LPL obtinguts per la resta de teixits de macaco van ser del mateix ordre que els valors descrits en teixit de rata (Ricart-Jane, 2003) (Taula 4). Tanmateix, la manipulació d'aquests macacos prèvia a l'extracció dels teixits va ser, molt probablement, més estressant que la manipulació que vam fer a les rates. Això va ser degut a la diferent gestió dels dos models animals, conseqüència de les dimensions i la dificultat en la manipulació: així com les rates es poden sacrificar sense necessitat d'immobilització, el macaco requereix immobilització i anestèsia prèviament al sacrifici, segons el procediment autoritzat. Aquesta situació, més estressant pels animals, podria causar una caiguda en l'activitat enzimàtica dels teixits adiposos, ja que l'estrès agut provoca una ràpida caiguda de l'activitat LPL en adiposos de rata i alliberament de l'LPL al torrent sanguini (Casanovas et al., 2007; Ricart-Jane et al., 2005). Per tant, els valors d'activitat LPL dels teixits adiposos possiblement estiguessin subestimats.

Una altra explicació d'aquestes diferències entre l'activitat LPL en teixits de rata i macaco pot ser en base a les diferències d'activitat metabòlica basal de totes dues espècies d'animals. Com a norma general, la taxa metabòlica basal és inversament proporcional a la massa corporal dels animals i per tant, major en rata que en macaco (Adelman et al., 1988). Per això, en macacos els requeriments energètics dels teixits són menors que en rata i, per tant, l'activitat enzimàtica dels teixits pot ser menor.

L'ús del TAB visceral per a la purificació parcial de l'LPL ha resultat en el reconeixement de les isoformes de pl l'LPL en aquesta espècie per primera vegada. D'acord amb la bibliografia, aquest teixit presenta major activitat específica en comparació a d'altres teixits adiposos d'humans (Ruge et al., 2006). Aquest fet podria haver afavorit la purificació parcial i detecció de l'LPL i les seves isoformes de pl. El patró d'isoformes de pl de l'LPL del TAB visceral va contrastar molt amb tots els patrons de teixits de rata estudiats fins aleshores, tant d'adult com de cria (Figura 16 i Figura 23, respectivament). Aquesta elevada diferència feia referència a l'interval i als percentatges de distribució.

Pel que fa a l'interval de distribució de les isoformes, tots els teixits de rata van presentar un interval de pH global des de 6,52 fins a 8,53; però el macaco va revelar un interval força més bàsic, fins a 8,66. Tot i que el TAM de rata tampoc va presentar isoformes de pl inferior a pH 7, no va arribar a superar el pH de 8,53.

Fent referència a la distribució de la proteïna, en rata les isoformes més abundants van ser les de pH proper a 7 (en el cas del TAM, pH 7,8); però en el primat, les isoformes més abundants són en l'interval de pH de 8 fins a 8,5.

La descripció de les isoformes de l'LPL en plasmes postheparínics humans (Badia-Villanueva et al., 2014) també mostra característiques d'aquesta LPL (interval de distribució i abundància relativa) força més bàsiques que la dels teixits de rata. El resultat d'aquest treball en humans s'apropa més a l'obtingut en macaco, sobretot per la l'abundància relativa entre les diferents isoformes de pl.

Però els resultats del plasma postheparínic humà i del TAB de macaco no són resultats plenament comparables, perquè el resultat en humans és el sumatori de l'LPL alliberada de tot l'organisme per l'heparina: la majoria de l'LPL humana es troba acumulada en el múscul (baixa concentració, però gran quantitat de teixit per individu) i en el TAB (elevada concentració d'aquesta proteïna, però menor quantitat de teixit per individu). Malgrat això, ens aporta una referència sobre quines deuen ser les isoformes de l'LPL madures predominants en humans.

A més, la idea que l'LPL de macaco i d'humà siguin més similars que amb la de rata és coherent amb la relació evolutiva entre totes tres espècies (Holmes et al., 2011; Raisonier et al., 1995).

7. Conclusions: distribució

- Hem descrit per primera vegada la presència d'isoformes de l'LPL en un sol cor de rata. Es descarta així, la possibilitat que les isoformes corresponguin a un variants al·lèliques de l'LPL provinents d'un elevat nombre d'individus.

- Hem descrit per primera vegada les isoformes en TAB epididimal, TAM i múscul de rata adulta. Pel cor i plasma postheparínic ja es va descriure en anteriors treballs del grup de recerca. A més, hem caracteritzat i comparat estadísticament els patrons d'isoformes (modelització de la distribució de les isoformes de pl de l'LPL de cada teixit en base als pl i abundàncies relatives) dels teixit de rata adulta: cor, TAB, TAM i múscul. Aquesta comparació ha permès diferenciar dos tipus de patrons segons el solapament dels pl de les seves isoformes: el cor presenta un tipus de patró, mentre que el TAB, TAM i múscul presenten un altre tipus.

- Hem descrit per primera vegada la presència d'isoformes en teixits (cor i TAM) de cria de rata alletant. També hem descrit que els patrons de cor i TAM de rata adulta segueixen distribucions molt similars als del mateix teixit en les etapes més primerenques del seu desenvolupament. Al fetge de cria de rata ha estat metodològicament impossible descriure clarament la presència d'un patró d'isoformes de pl de l'LPL, malgrat haver estat capaços de purificar-la parcialment per cromatografia d'afinitat en heparina-*Sepharose*.

- Hem treballat per primera vegada amb mostres de teixit obtingudes de macaco i n'hem descrit l'activitat LPL en 10 teixits d'aquesta espècie, els quals són molt similars als resultats obtinguts, en rata, en estudis previs del grup de recerca.

- Hem pogut purificar parcialment l'LPL del teixit adipós blanc visceral de macaco, immunodetectar-la amb l'anticòs 5D2 i hem descrit per primera vegada que el macaco també presenta d'isoformes de pl de l'LPL en TAB.

Funció de les isoformes de pl de l'LPL

1. Antecedents

En el capítol precedent, la descripció de les isoformes de pl de l'LPL i l'existència de diferències entre els patrons –ben definits entre teixits, edats i espècies– d'aquestes isoformes va deixar al descobert tot un seguit de dubtes sobre la seva rellevància. A partir d'aquest descobriment, ens vam plantejar tot un seguit de possibilitats en referència amb el paper funcional d'aquestes isoformes en el metabolisme lipídic.

Totes les isoformes tenen la mateixa afinitat per l'heparina?

Una de les característiques en l'estudi de les isoformes de pl de l'LPL va ser la seva afinitat per l'ancoratge, ja sigui *in vivo* als HSPG o *in vitro* a l'heparina. L'alta afinitat de l'LPL per l'heparina ha estat àmpliament estudiada (Bengtsson-Olivecrona and Olivecrona, 1985; Lookene et al., 1996; Lutz et al., 2001) i utilitzada per a la purificació parcial de l'LPL en un elevat nombre d'estudis (Ben-Zeev et al., 2002; Bergo et al., 1996b, 1997; Wu et al., 2003). Tanmateix, l'objectiu d'aquests estudis va ser la discriminació de les dues poblacions d'LPL: enzim actiu i enzim inactiu. Aquesta separació es basa en el fet que la forma monomèrica, a més de presentar baixa afinitat per l'heparina, no presenta activitat enzimàtica (Osborne et al., 1985). Els resultats d'aquesta discriminació es van fer servir per correlacionar la quantitat d'LPL (per massa de proteïna total) amb la seva funcionalitat (per la seva activitat enzimàtica). En tots els casos, diversos autors van tractar l'LPL amb alta afinitat per l'ancoratge com a una única població de proteïnes. A partir d'aquí, els treballs anteriorment citats, van concloure l'efecte de diferents situacions sobre l'expressió i regulació de l'LPL:

- L'estudi de G. Wu (2003) descriu l'LPL segons la seva localització i la resposta de cada tipus (activa i inactiva) segons la resposta al dejuni.
- Segons M. Bergö (1997), el comportament de les dues poblacions d'LPL (activa i inactiva) davant del dejuni és el mateix, únicament varia la resposta entre individus adults i joves.

En el nostre cas, vam descartar l'estudi de les formes inactives i monomèriques i ens vam centrar en la subpoblació de l'LPL activa i, per tant, dimèrica. L'objectiu va ser l'obtenció de diferents subpoblacions de l'LPL segons afinitat a l'heparina. Així, es volia determinar si les isoformes presentaven diferències pel que fa a la intensitat del seu ancoratge.

Totes les isoformes són actives?

La presència d'un conjunt d'isoformes de l'LPL ens va plantejar el dubte de si totes les variacions de la proteïna mantenen la funció enzimàtica o, per altra banda, alguna d'aquestes isoformes representaven un reservori inactiu de proteïna a fi d'augmentar ràpidament l'activitat específica d'aquell teixit en situacions d'urgència metabòlica. Aquest augment tindria com a objectiu afrontar variacions en l'estat fisiològic de l'organisme, en moments en què el temps d'activació de tota la maquinària de síntesi de proteïnes no donaria resposta a la necessitat fisiològica (p.e. situacions d'estrès). Aquesta variació ràpida entre formes actives/inactives podia dur-se a terme mitjançant PTM.

Però la valoració de l'activitat enzimàtica de l'LPL sempre la vam fer en mostres que van incloure tot el conjunt de les isoformes, ja que en el mètode de purificació parcial de l'LPL eluïen totes les isoformes de pl a la vegada. Així, el resultat de la valoració de l'activitat lipasa va ser, sempre, el sumatori de la producció del conjunt d'isoformes de l'enzim.

Per altra banda, fins aquest punt, sempre ens vam basar en la detecció de les isoformes desnaturalitzades mitjançant anticossos (SDS-PAGE seguit de WB) en tots els estudis que vam fer. En aquestes condicions d'anàlisi, els resultats obtinguts ens van donar informació sobre la presència de la proteïna (i per tant, pl i abundància relativa) o la seva absència. Però en abordar l'estudi de la funció de les isoformes de pl de l'LPL, vam haver de plantejar alternatives a la detecció de la proteïna una vegada desnaturalitzada.

Si les isoformes tenen diferents funcions, varien de forma diferent en situacions fisiològiques en què l'activitat LPL total varia?

L'estudi fet fins ara sobre el patró de l'LPL en diferents teixits es va basar en una situació fisiològica control. Això va significar que les condicions d'estabulació van mantenir els animals en una zona de confort: temperatura de 22°C i menjar i beguda a lliure disposició. Com que l'LPL és un enzim clau pel que fa a la regulació metabòlica a diferents teixits (Kersten, 2014), la seva activitat i massa varia molt en diferents situacions fisiològiques. Alguns exemples d'aquesta regulació en rata són:

- l'estrès agut, el qual provoca una reducció de l'activitat lipasa en TAB epididimal i augment en plasma (Casanovas et al., 2007; Ricart-Jane et al., 2005). Tanmateix, aquesta reducció de l'activitat no comporta una reducció de la quantitat d'ARNm de l'LPL (Ricart-Jane et al., 2005).
- el dejuni, que causa una reducció en l'activitat lipasa en el teixit adipós, però un augment en cor, i la realimentació (Bergo et al., 1996a, b, 1997; Llado et al., 1999; Quig et al., 1983; Ruge et al., 2001). Aquest diferent comportament està relacionat amb el propòsit dels NEFA en cada teixit: mentre que en cor, se n'augmentarà el consum, en TAB es redueix l'emmagatzematge (Hultin et al., 2013).
- l'edat és un causant de la reducció de l'activitat lipasa per gram de teixit en TAB (Bergo et al., 1997). Aquesta reducció no és deguda a la disminució de la síntesi d'LPL, sinó a mecanismes de regulació posttraduccional.

- el fred (Carneheim et al., 1984; Deshaies et al., 1986; Klingenspor et al., 1996), s'ha demostrat que és un inductor de l'activitat LPL en TAM. En TAB la tendència és a augmentar l'activitat lipasa, però no és sempre un augment significatiu.
- l'activitat física o exercici provoca un augment significatiu de l'activitat lipasa en TAB (Deshaies et al., 1986), la qual disminueix en aturar l'activitat física (Simsolo et al., 1993).

Per tant, està àmpliament estudiat que segons la situació fisiològica en què es trobi l'animal, l'activitat LPL variarà específicament en cada teixit. Però no se sap com responen les isoformes davant de variacions tan importants de l'activitat de l'LPL. L'estudi d'aquestes variacions ens va semblar especialment interessant en situacions en què el nivell d'expressió del gen de l'LPL no variava. Així, la regulació no era a nivell de transcripció sinó a nivell de traducció o posttraducció.

Tot i que fins ara l'anàlisi de la funció de les isoformes de pl de l'LPL l'havíem plantejat en mostres provinents de macaco, aquesta part experimental en diferents situacions fisiològiques va ser impossible fer-la amb aquest model animal. El macaco té uns requeriments d'estabulació que van fer impossible mantenir-los en diferents situacions fisiològiques. A més, l'obtenció d'aquestes mostres havia estat possible gràcies al consentiment de BioSystems S.A. perquè poguéssim extraure els teixits d'interès. Així, per a l'estudi del patró d'isoformes de pl de l'LPL en situacions fisiològiques, vam recuperar el model animal de la rata.

2. Objectius específics

Una vegada demostrada la presència d'isoformes de pl de l'LPL a teixits de rata i de macaco, ens plantegem estudiar la diversitat funcional de les isoformes avaluant diferents aspectes:

- En teixit adipós blanc de macaco, volem determinar si totes les isoformes són enzimàticament actives (reconeixement pel substrat) o no.
- En el mateix teixit de macaco, volem estudiar si totes les isoformes tenen la mateixa afinitat per l'heparina. Aquest estudi es basa en l'afinitat per l'heparina, perquè és la molècula utilitzada pel sistema de purificació parcial per cromatografia d'afinitat i, sobretot, perquè la interacció entre l'LPL i els proteoglicans de tipus sulfat de l'endoteli capil·lar afecta clarament la vida mitjana fisiològica de l'enzim.
- En rata, volem determinar si les variacions fisiològiques de l'activitat LPL (en situacions agudes com ara el dejuni, la realimentació i el fred) es produeixen a través de modificacions del patró d'isoformes de pl de cada teixit.
- A continuació, volem desenvolupar un sistema estadístic de caracterització per demostrar l'existència o no de poblacions d'isoformes de pl (clústers) independentment del teixit d'origen i estudiar les seves variacions en diferents situacions fisiològiques.

3. Plantejament experimental per a l'estudi de la funció

Pels diferents objectius plantejats en aquest bloc de resultats, vam treballar amb els models animals fets servir anteriorment: macaco i rata. Vam haver de recuperar el model en rata per la impossibilitat de mantenir macacos en les mateixes situacions fisiològiques a les quals van ser mantingudes les rates. A més de la despesa per un nombre tan elevat d'animals, el seu manteniment a diferents temperatures (4°C i 22°C) i condicions d'alimentació van fer impossible aquest plantejament. Cal recordar que les mostres de teixit de macaco anteriorment estudiades van ser d'animals aprofitats de l'extracció d'altres teixits per part de l'empresa BioSystems.

A continuació, es descriu el model animal, el plantejament experimental fet servir en cada cas i l'obtenció de mostra per a macaco i rata.

3.1. Macaco de Java

En l'estudi de la funció de les isoformes de l'LPL també vam fer servir la mostra de TAB visceral de macaco amb què s'havia treballat pel patró d'isoformes de l'LPL en macaco. És per això que el disseny experimental és exactament el mateix que el descrit en els anteriors apartats de macaco.

El procediment d'extracció de teixits de macaco està degudament contemplat per l'estudi número S43652 de Harlan Laboratories i el comerç dels animals és regulat pel CITES (the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora).

3.1.1. Activitat lipasa i afinitat per l'heparina de les isoformes de pl de l'LPL

L'objectiu d'aquests assajos va ser estudiar diferències de funcionalitat de les isoformes de pl de l'LPL. Per això vam treballar amb el mateix model experimental que en el patró d'isoformes de l'LPL en teixits de macaco de Java. Aquest model ja ens havia garantit la correcta manipulació de les mostres a fi de detectar les isoformes de pl de l'LPL. Per tant, a partir del TAB visceral de macaco es va analitzar tant l'activitat lipasa de les diferents isoformes com la seva afinitat per l'ancoratge.

Breument, els animals van ser estabulats a 22±2°C i humitat relativa del 40-70%, amb un cicle de llum/fosc de 12h/12h. Els van alimentar amb pinso (Teklad 2056NC de Harlan Laboratories Models, Sant Feliu de Codines, Barcelona) i aigua *ad libitum* més una peça de fruita al dia. Els animals van ser estabulats en grups de 3-5 animals per gàbia.

3.1.2. Obtenció de les mostres

Les mostres destinades a aquest objectiu van ser les mateixes que les obtingudes per a la descripció del patró d'isoformes de l'LPL en teixits de macaco de Java.

Breument, després del sacrifici de l'animal, es van extreure els diferents teixits d'interès. Ràpidament van ser congelats en nitrogen líquid a fi de mantenir

l'activitat lipasa. Posteriorment van ser transportats fins al Departament de Bioquímica i Biomedicina Molecular de la Facultat de Biologia en neu carbònica i emmagatzemats a -80°C fins al moment de fer-ne ús.

3.2. Rata

Vam fer servir animals mascles de la soca Wistar (Harlan Laboratories Models, Sant Feliu de Codines, Barcelona) com els anteriors models. Fins a l'inici dels experiments, els animals van ser estabulats a la sala d'animals del departament de Bioquímica i Biomedicina Molecular de la Facultat de Biologia de la UB, en unes condicions de temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ i d'humitat del $50\pm 5\%$, en un cicle de llum/fosc de 12h/12h. i amb menjar (ref. A04, Panlab, Cornellà) i beure *ad libitum*.

Aquest procediment va ser dut a terme prèvia aprovació per part del Comitè Ètic d'Experimentació Animal (CEEA) de la Universitat de Barcelona i del Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural de la Generalitat de Catalunya (procediment amb número d'ordre DAAM 7440).

3.2.1. Distribució de l'LPL en teixits de rata adulta en diferents situacions fisiològiques

Aquest model experimental en rata va pretendre provocar una resposta metabòlica adaptativa a una nova condició ambiental, una situació que afectés l'activitat enzimàtica de l'LPL, ja en fos un augment o un decrement.

Vam decidir estudiar els efectes del fred, del dejuni i de la realimentació en el patró de distribució de les isoformes de l'LPL perquè els seus efectes en l'activitat lipàsica en diferents teixits de rata són àmpliament descrits. Durant l'aclimatació, a l'inici del tractament i abans del sacrifici, els animals van ser pesats per fer un seguiment del creixement i per descriure l'efecte dels diferents tractaments en el pes dels animals.

La quarantena dels animals es va fer en les condicions habituals d'estabulació dels animals d'experimentació, les anteriorment explicades. Tanmateix, per provocar les adaptacions dels animals al fred i al dejuni/realimentació, vam establir unes condicions d'estabulació (Figura 49) posteriors a les de la quarantena:

- a) **Resposta al fred:** un grup de 10 animals va ser estabulat a la cambra freda del Departament de Bioquímica i Biomedicina Molecular (Cambra freda 3), a una temperatura de 4°C des de les 16h del dia anterior al sacrifici.
- b) **Resposta al dejuni/realimentació:** el segon grup d'animals (20 animals) va ser estabulat a la sala d'animals del Departament, però en aquest cas, se'ls va retirar el menjar a les 16h del dia anterior al sacrifici. A 10 d'aquests animals mantinguts en dejuni durant tota la nit, se'ls va col·locar pinso a la gàbia dues hores abans de ser sacrificats (9 am) per provocar la realimentació.
- c) **Control:** un grup de 10 animals es va mantenir a $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ i amb menjar i beguda *ad libitum* fins al moment del sacrifici.

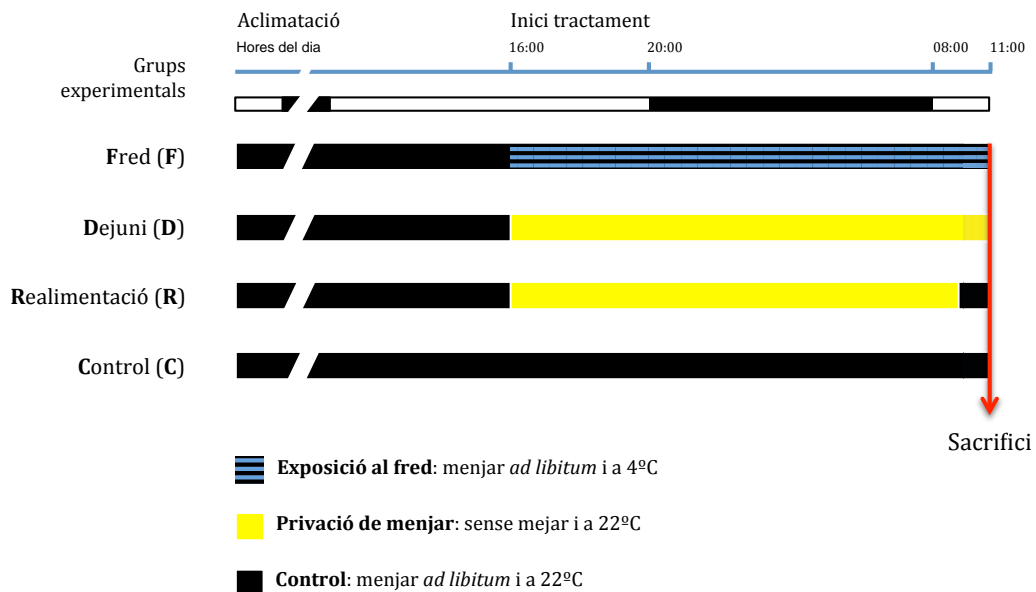


Figura 49. Disseny experimental del tractament per a la resposta a les diferents situacions fisiològiques. Esquema dels grups experimentals, pel que fa a temps, temperatura i disponibilitat de menjar. Cada grup experimental està format per 10 animals.

Habitualment, els animals són estabulats de dos en dos per gàbia. Però en el procediment de resposta al fred, per evitar que els animals s'escalfessin l'un a l'altre, calia mantenir-los individualment a les gàbies. Per altra banda, per evitar la coprofàgia dels animals privats del menjar, vam col·locar una reixa que mantenia separades les rates de les serradures (i dels excrements).

Per tal de reduir el total d'animals de l'experiment, el grup "Control" ho era tant pels animals de "Resposta al fred" com pels de "Resposta al dejuni/realimentació". Així, el grup "Control" havia de complir les condicions de tots dos altres grups: estabulació individual per gàbia i amb reixa al terra. Conseqüentment, tots quaranta animals havien de compartir les mateixes condicions d'estabulació.

El fet d'haver de mantenir tots els animals durant el tractament engabiats individualment i sobre una reixa, podria ser un factor que provoqués estrès a l'animal, i que els resultats obtinguts per la variació de les situacions fisiològiques quedessin emmascarats per una mala manipulació i planificació. Per això, dos dies abans de l'inici del tractament, ja els vam col·locar individualment i amb reixa al terra de la gàbia per tal que s'habituessin a la nova condició d'estabulació.

3.2.2. Obtenció de les mostres

Els animals van ser sacrificats per decapitació i ràpidament vam extraure els teixit d'interès per l'objectiu: cor, TAB epididimal i TAM. Els teixits extrets es van congelar immediatament en nitrogen líquid per evitar la pèrdua d'activitat enzimàtica. Posteriorment, es van mantenir congelats a -80°C fins al moment d'ús.

4. Activitat lipasa de les isoformes de pl de l'LPL de TAB de macaco

4.1. Substrat suïcida de lipases

L'estudi de l'activitat lipasa de cada isoforma de pl de l'LPL el vam plantejar a partir de la recerca del Dr. Hermetter (Morak et al., 2009), la qual descriu l'ús de substrats per a lipases que uneixen covalentment a l'enzim part del producte de la reacció. Aquest substrat suïcida (SS) és posteriorment detectable per un fluoròfor que també queda unit a la l'enzim i la imatge resultant que s'obté és una descripció únicament de les lipases actives de la mostra. Mitjançant diferents fluoròfors, es poden obtenir imatges en què se solapen diferents mostres (i per tant, situacions, tractaments, teixits, ...) i fàcilment es detecten variacions en patrons o expressió de lipases.

Aplicat a la nostra investigació, l'objectiu de comparar diferents patrons d'activitat lipasa no va semblar encaixar-hi. Però sí que va sorgir la possibilitat de descriure en un sol assaig quines eren les isoformes actives i quines no.

L'adaptació del protocol inicial descrit en el treball de M. Morak (2009) va ser duta a terme al nostre laboratori per M. Badia-Villanueva (tesi doctoral en procés) en mostres d'LPL parcialment purificada de TAB de rata i humans. La principal dificultat a superar va ser la incubació amb el substrat suïcida de la mostra després d'haver eluït de la cromatografia d'afinitat. Els factors que vam haver de tenir en compte van ser:

- La impossibilitat de conservar la mostra congelada per fer-ne ús posteriorment. El motiu és que la congelació i descongelació provoca la pèrdua de part de l'activitat enzimàtica de l'LPL. Per tant, en cas d'aparèixer isoformes inactives, els resultats podrien ser atribuïts a la conservació de la mostra i no al fet diferencial entre isoformes.
- L'albúmina (BSA), la qual s'utilitza com a conservant de l'activitat enzimàtica en les mostres de les fraccions obtingudes en la cromatografia d'afinitat, no es va poder fer servir per a mantenir l'activitat de la mostra, ja que aquesta proteïna presenta certa activitat esterasa (Goncharov et al., 2015; Kim et al., 2013; Mariam et al., 2014). Aquest fet de la BSA implicava que podíem obtenir falsos positius en els resultats i que es reduïa la relació substrat/enzim.
- El temps i temperatura d'incubació, ja que la vida mitjana de l'LPL a 37°C és de 30 minuts. Aquesta incubació calia que fos òptima per a l'acció de l'LPL sobre del SS, però que no afectés en excés la viabilitat enzimàtica.

Una vegada completada la posada al punt del procediment en mostres de TAB de rata i de TAB humà, vam treballar amb les mostres de l'LPL purificada del TAB visceral de macaco. Tal i com s'explica en l'apartat de material i mètodes (2.8. Substrat suïcida de lipases (DABGE)), no vam poder quantificar la proteïna ni valorar l'activitat lipasa de les fraccions prèviament al desenvolupament de l'assaig. Les fraccions de la purificació parcial a partir de les quals vam generar la reserva d'LPL les vam decidir en base a l'experiència d'anteriors purificacions

parcials de l'LPL, ja que l'inici de l'aparició de l'activitat lipasa va ser sempre molt constant (Figura 12 i Figura 45). Per això, vam utilitzar les fraccions de 4 a 7 des de l'inici de l'elució.

En el resultat de la incubació de la reserva de l'LPL de TAB visceral de macaco amb el SS (Figura 50) vam veure clarament un seguit de marques a l'alçada de pes molecular aparent esperat (56 kDa). Aquestes marques van correspondre, per l'experiència en el patró de macaco (Figura 48), amb l'interval de pH de distribució de les isoformes d'aquest teixit. Aquest conjunt de lipases actives va constar d'un mínim de 8 isoformes amb variacions importants en la intensitat.

En menor mesura, també vam detectar un seguit de marques de pI més àcid i de menor pes molecular que l'LPL. Aquestes marques van ser, possiblement, degudes a una altre conjunt de lipases que també es purifiquen parcialment amb les columnes d'heparina-*Sepharose* i que també van ser reconegudes pel SS. Aquestes altres lipases demostren que l'anàlisi funciona correctament també per altres enzims. Tanmateix, la proporció d'aquesta segona lipasa respecte el total és pràcticament menyspreable.

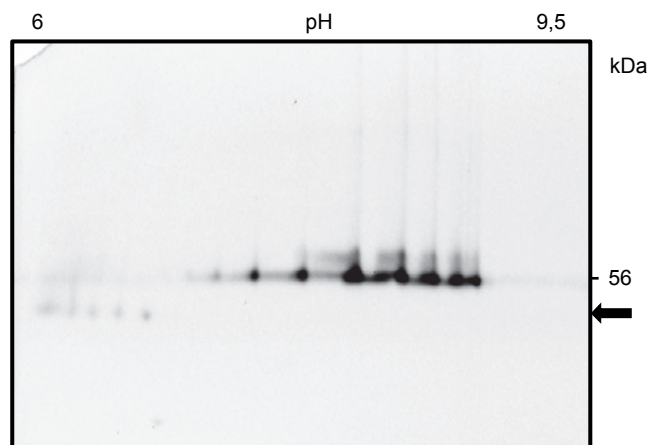


Figura 50. 2DE de la reserva de l'LPL de TAB visceral de macaco. Mostra de TAB visceral incubada amb SS de lipases, enfocada en tires d'IEF de pH 6-11 en 11 cm i revelada per escàner de fluorescència. Fins a 300 µg de proteïna total. kDa assenyala el pes molecular aparent de l'LPL (56 kDa). La fletxa indica altres lipases revelades per 2DE-DABGE.

Una vegada vam haver detectat les isoformes de l'LPL actives (Figura 50), el resultat obtingut es va comparar amb els resultats de dos controls inclosos (Figura 51), ja que en aquest experiment vam treballar amb dues incubacions addicionals del mateix purificat parcial:

- A. Control de manipulació: aquesta mostra es va incubar sense SS i es va detectar la proteïna per WB.
- B. Control del patró: mostra incubada amb SS, però es va detectar la proteïna per WB en lloc d'utilitzar l'escàner de fluorescència.

Els objectius dels controls van ser poder dir si el substrat va afectar a la capacitat de detecció de l'LPL o al patró d'isoformes de pl de l'LPL (en comparar els resultat obtinguts a "B" respecte "A") i del total d'isoformes, quines van ser actives i quines no (en comparar els resultats del revelat per fluorescència i el control "B").

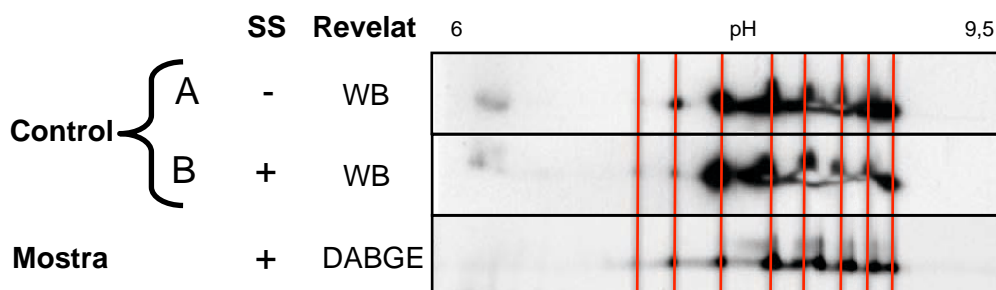


Figura 51. 2DE de l'LPL de TAB visceral de macaco. Mostres enfocades en tires d'IEF de pH 6-11 en 11 cm. Fins a 300 µg de proteïna total. A) Control de manipulació, B) Control del patró. Incubació amb substrat suïcida (SS) (+) o sense (-). "Revelat" indica el sistema de visualització del patró: mitjançant immunodetecció (WB) o lectura en escàner de fluorescència (DABGE). Imatge de "Mostra" importada de la **Figura 50**. Les línies vermelles marquen els pI de les isoformes d'acord amb el Control A.

En analitzar els dos controls per WB (B respecte d'A), vam veure que la detecció de les isoformes no es va veure compromesa per la manipulació de la mostra durant el procés d'incubació ni pel tractament amb el substrat suïcida. D'aquesta manera, podem estar segurs que la unió de la sonda a la seqüència d'aminoàcids ni modificava el pes molecular de l'LPL ni en feia variar les característiques que determinen el pI de les isoformes. Després d'aquesta confirmació, ja vam poder comparar els resultats obtinguts de la mateixa mostra revelada per DABGE amb qualsevol dels controls (Figura 51).

La primera característica que vam avaluar va ser el nombre d'isoformes actives respecte al nombre total. Per això vam comptar el nombre de positius detectats per DABGE en relació als descrits en WB (línies vermelles de la Figura 51). Aquest punt va resultar que totes les isoformes de pI de l'LPL són actives (8 de 8), ja que en tots els casos vam detectar l'LPL per fluorescència. A més, les isoformes van mantenir els seus pI. La petita diferència de pI de les isoformes més bàsiques pot ser deguda per la deformació del gel durant el tractament pel revelat en DABGE, a diferència del procés d'immunodetecció.

Una altra característica que ens vam plantejar avaluar va ser la relació d'intensitats obtingudes per WB i per DABGE. Tanmateix, aquesta relació només ens aportaria informació sobre la proporció de proteïna activa (SS) respecte el total (WB). Per això era necessari suposar que totes les isoformes tenien la mateixa afinitat pel substrat, que el total de la mostra quedava unida a una sonda de reconeixement d'activitat i que el WB detectava tota la proteïna de forma constant. Per totes aquestes suposicions, no vam veure prou suportades les conclusions que traguéssim d'aquests resultats.

4.2. Discussió: activitat lipasa de les isoformes

Primerament, podem dir que l'adaptació del DABGE ens ha permès detectar l'LPL activa provinent de columnes de purificació parcial en heparina-*Sepharose*. Però el resultat més important obtingut en els experiments amb el substrat suïcida de lipases és que totes les isoformes de pl de l'LPL de TAB de macaco són actives. Aquests resultats són coherents amb els treballs d'autors com Bergö (1996b), en què es correlaciona l'activitat LPL obtinguda en l'elució de la cromatografia amb la massa total de proteïna LPL.

Una suposició podria ser que l'anticòs no reconegués les isoformes inactives de la mateixa manera que les isoformes actives. Aquesta possibilitat justificaria que la coincidència entre isoformes detectades per WB o DABGE fos del 100%. Però està descrit que l'anticòs 5D2 és capaç de detectar tota l'LPL, tant l'activa com la inactiva (Peterson et al., 1992; Vilella et al., 1993). Per tant, podem estar segurs dels resultats obtinguts en relació d'isoformes actives respecte el total d'isoformes. En altres proteïnes, l'aparició d'isoformes de pl està associat a la pèrdua d'activitat de l'enzim o un mal funcionament (Martin-Bernabe et al., 2014; Roudeau et al., 2015). Per aquest motiu, possiblement l'aparició d'isoformes inactives es detecti en casos de regulació posttraduccional de l'LPL, com a mesura de regulació ràpida de l'activitat enzimàtica. Una altra situació que podria comportar l'aparició d'isoformes de pl de l'LPL inactives són les hipertriacilgliceridèmies provocades per deficiència funcional de l'LPL (Nierman et al., 2005) o per deficiència en les proteïnes accessòries de l'LPL (i.e. GPIHBP1, LMF1 o Sel1L). En aquestes situacions, pot ser una dada rellevant la proporció d'isoformes actives/inactives i estudiar l'aparició de nous patrons d'isoformes en individus amb mutacions en el gen de l'LPL.

El sistema de purificació parcial de l'LPL és específic de dímers d'LPL (actius, amb alta afinitat per l'heparina), mentre que els monòmers són descartats (inactius i amb menor afinitat per l'heparina). A més, la incubació de la mostra amb el SS es fa en condicions favorables per a mantenir l'estabilitat dels dímers d'LPL. No és fins a l'enfocament en 2DE que es desnaturalitza tota la mostra i el dímer monomeritza. Per tant, estem convençuts que els resultats descriuen les isoformes d'alta afinitat per l'heparina (dímers). Els resultats aquí obtinguts són la representació de l'LPL tant endotelial com encara continguda a les cèl·lules parenquimàtiques. Per tant, el fet que no es detectin isoformes inactives dóna suport a la idea dels autors que neguen l'existència d'una reserva d'LPL intracel·lular inactiva a punt per fer servir en funció dels requeriments del teixit (Bergo et al., 1996b).

Tanmateix, aquesta reserva intracel·lular podria existir i ser present, però mantinguda de forma activa en vesícules (Wu et al., 2003). Aleshores, en casos de necessitat d'augmentar l'ingrés de NEFA, únicament caldria transportar aquesta reserva, sense haver-la d'activar per PTM. Aquesta resposta és molt més ràpida que iniciar la síntesi de nova proteïna.

Per aquest moviment des de les cèl·lules parenquimàtiques fins a la llum endotelial, està descrit que la GPIHBP1 es desplaça des d'un punt a l'altre i a l'inrevés (Davies et al., 2012). Aquesta proteïna arrossegaria, en vesícules, a través

de l'endoteli la nova LPL per donar resposta a la nova situació fisiològica. El moviment bidireccional de la GPIHBP1 podria ser un mecanisme de regulació de l'LPL. Primerament, en desplaçar de forma massiva la GPIHBP1 des de la cara luminal a la cara apical dels endotelis, l'LPL ja quedaria separada físicament del seu substrat i, per tant, la capacitat real d'hidròlisi de TAG circulants en VLDL o QM es veuria reduïda. A més, l'LPL en l'espai de la membrana extracel·lular podria ser inhibida per l'ANGPTL4 present en aquest espai (Cazes et al., 2006; Nilsson et al., 2012). Tanmateix, la inhibició de l'LPL per part d'ANGPTL4 és específica de certes situacions en què s'expressa l'ANGPTL4. Per altra banda, la separació física de QM i VLDL de l'LPL podria dur-se a terme ràpidament i no es detectaria pèrdua d'activitat LPL del teixit.

5. Afinitat per l'heparina de les isoformes de pl de l'LPL de TAB de macaco

5.1. Elució en gradient esgraonat

Fins ara, vam utilitzar gradients creixents i discret de NaCl (veure materials i mètodes, 1.1. Cromatografia d'afinitat en columnes d'heparina-Sepharose), per a elució de l'LPL (Figura 12). En aquest nou model experimental, teníem l'objectiu de detectar les diferències de les isoformes en l'afinitat per l'ancoratge a l'heparina-Sepharose en cada increment de concentració de NaCl. Per això, també vam utilitzar un gradient creixent de NaCl, però discret per petits augments de la seva concentració. El temps de cada tampó d'elució a concentracions creixents de NaCl va assegurar haver extret tota la proteïna de la columna.

5.1.1. Purificació parcial de l'LPL

El primer assaig va ser estudiar l'elució de l'LPL en diferents concentracions de NaCl (Figura 52), des de la concentració en què s'alliberen les proteïnes amb baixa afinitat per l'heparina (0,75 M) fins a la concentració que es fa servir per eluir l'LPL habitualment (1,5 M).

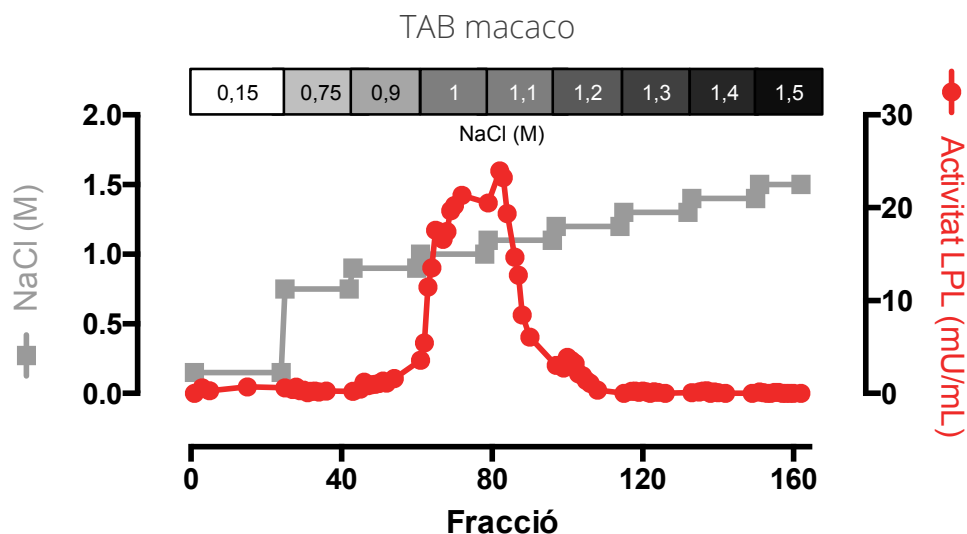


Figura 52. Purificació parcial de l'LPL de TAB visceral de macaco per cromatografia d'afinitat en gradient de NaCl creixent i esgraonat. Mostra de TAB visceral de diversos animals (n=13). En diferents moments d'un gradient creixent de NaCl (quadrats grisos), es van escollir diverses fraccions i se'n va quantificar la l'activitat lipasa (cercles vermells).

A partir de les fraccions obtingudes en la purificació parcial per gradient de NaCl creixent i esgraonat, vam analitzar el contingut en LPL a cada concentració de NaCl del tampó d'elució, a través de la immunodetecció en 1DE (Figura 53). Vam crear reserves de cada concentració per poder treballar. Cada reserva es va crear a partir de les fraccions següents:

- NaCl 0,9 M → Fraccions 46-54
- NaCl 1,0 M → Fraccions 61-64 (prepic - P) i 65-79 (reserva - R)
- NaCl 1,1 M → Fraccions 82-87
- NaCl 1,2 M → Fraccions 100-106
- NaCl 1,3 M → Fraccions 117-124
- NaCl 1,4 M → Fraccions 135-140
- NaCl 1,5 M → Fraccions 151-156

El resultat d'aquest assaig va servir per veure com elueix l'LPL segons la concentració de NaCl, sense tenir en compte l'activitat enzimàtica. Així, vam poder correlacionar l'activitat eluïda amb la proteïna.

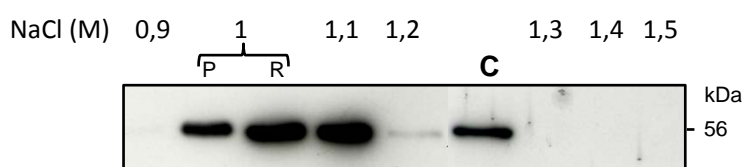


Figura 53. 1DE de l'elució de l'LPL de TAB de macaco en gradient de NaCl creixent i esgraonat. Anàlisi per WB de les diferents reserves d'elució segons concentració de NaCl (des de 0,9 fins a 1,5 M), generades a la **Figura 52**. P i R, respectivament, fraccions del prepic o reserva de l'elució a 1 M NaCl; C, control positiu d'LPL bovina. kDa assenyalen el pes molecular aparent de l'LPL (56 kDa).

Els resultats de la Figura 53 ens van respondre que l'LPL comença a eluir a una concentració 1 M NaCl. A partir d'aquí, en cada augment de força iònica, vam seguir detectant LPL per 1DE-WB fins a la concentració d'1,2 M NaCl. Els resultats van correlacionar força bé la presència de proteïna LPL amb els valors d'activitat lipasa de les fraccions obtingudes en la purificació parcial de l'LPL. Tot i això, vam obtenir esgraons en què hi havia força proteïna, però baixa activitat LPL (p.e. Figura 53; carril NaCl 1,2 M).

Aquests resultats són coherents amb els treballs de purificació de l'LPL anteriorment citats (Bergo et al., 1996b, 1997; Wu et al., 2003), els quals detecten l'LPL activa a partir d'1 M i també obtenen el pic d'elució passat 1 M NaCl. Sobta l'aparició de banda d'LPL fins a tres concentracions diferents del tampó d'elució (des d'1 fins a 1,2 M NaCl). Però no es pot deduir què passa en cada moment de l'elució. En el disseny de l'elució, ja es va tenir en compte no arrossegar LPL entre diferents tampons, ja que es va passar prou tampó per rentar correctament la columna d'heparina-*Sepharose*.

En veure que els resultats per les dues reserves creades en l'elució a 1 M (P i R) NaCl van presentar característiques similar de pes molecular aparent i intensitat, vam unir aquestes dues reserves. A més, ens interessava analitzar el conjunt d'LPL eluït a aquesta concentració de NaCl.

Aquests resultats deixaven oberta la possibilitat que en cada reserva d'LPL segons concentració de tampó d'elució, hi hagués un conjunt d'isoformes de pI de l'LPL més o menys diferent.

5.1.2. Anàlisi per 2DE de l'LPL

L'única manera de diferenciar el conjunt d'isoformes d'LPL en cada reserva de diferent concentració de NaCl era mitjançant el desenvolupament de 2DE-WB. A partir dels resultats de la 1DE (Figura 53), vam preparar l'anàlisi de les mateixes reserves de l'LPL en 2DE-WB. Per fer-ho, vam escollir la reserva obtinguda en 1 M i 1,1 M de NaCl. Vam escollir aquestes reserves perquè:

- NaCl 1 M era l'inici de l'aparició de l'LPL en l'eluït i podria ser que les primeres isoformes de pI apareguessin en aquest moment.
- NaCl 1,1 M va arrossegar les isoformes que no es van haver eluït en 1 M NaCl.
- NaCl 1,2 M pràcticament no presentava senyal d'LPL, el qual era molt dèbil i no seria suficient pel desenvolupament de l'anàlisi per 2DE-WB.

A la Figura 54 es mostren les imatges obtingudes de les 2DE de les diferents reserves, revelades per WB. A més, vam incloure una mostra d'LPL de TAB de macaco obtinguda en una purificació parcial anterior (Figura 47), ja que de la columna en gradient esgraonat no disposàvem d'una imatge del conjunt d'isoformes eluïdes a 1,5 M NaCl. Aquesta mostra ens va servir de control del patró d'isoformes de l'assaig. Tant la reserva obtinguda en l'elució 1 M com 1,1 M van presentar un total de 8 isoformes de pI de l'LPL. A més, aquestes isoformes de pI van coincidir perfectament amb els pI de les isoformes de la mostra control (1,5 M). Per tant, els patrons de les isoformes que van eluir en les diferents concentracions de NaCl són els mateixos i no vam poder atribuir diferents afinitats per l'heparina a les isoformes de pI de l'LPL.

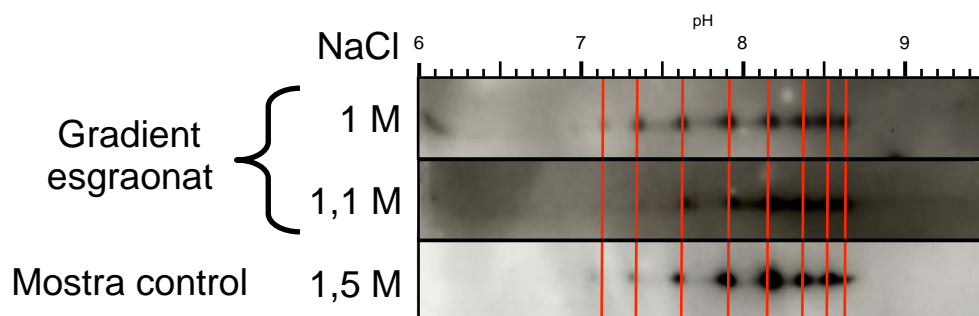


Figura 54. 2DE de l'LPL de TAB visceral de macaco eluïda en gradient de NaCl creixent i esgraonat. Anàlisi per WB de les diferents reserves d'elució de l'LPL segons dues concentracions de NaCl, generades a la **Figura 52** (1M i 1,1M NaCl) i avaluades per 1DE a la **Figura 53**. Mostra control generada a la **Figura 47**. Mostres enfocades en tires d'IEF de pH 6-11 en 11 cm. Les línies vermelles marquen els pI de les isoformes de l'elució a NaCl 1 M.

5.2. Elució en gradient constant

Tot i la conclusió extreta de l'elució en gradient creixent i esgraonat de NaCl, els resultats de l'elució de l'activitat lipasa de la columna (Figura 52) van mostrar que:

- Quan es va iniciar l'elució a NaCl 1 M no va aparèixer un pic d'activitat lipasa, com va passar en totes les anteriors purificacions parcials a NaCl 1,5 M (Figura 12);
- En canviar la concentració de NaCl del tampó d'elució des d'1 M fins a 1,1 M, es va produir un pic d'activitat lipasa.

Aquesta observació ens va plantejar que, possiblement, l'elució de l'LPL succeeix a la concentració 1 M NaCl, però que existeixen petites diferències en les isoformes que provoquen una elució contínua d'activitat enzimàtica i no un pic.

Amb aquesta hipòtesi, vam dissenyar un experiment en què vam allargar l'elució de l'LPL a 1 M NaCl fins a 6 hores, a diferència de les 2 hores fetes fins ara. D'aquesta manera, es va permetre que les possibles diferències entre els ritmes d'elució de cada isoforma, degudes a diferències en l'afinitat per l'heparina, es poguessin detectar.

5.2.1. Purificació parcial de l'LPL

L'assaig per a la purificació diferencial de l'LPL es va dur a terme tal i com s'explica a l'apartat de material i mètodes (1.1. Cromatografia d'afinitat en columnes d'heparina-Sepharose). Breument, després de l'elució de proteïnes de molt baixa afinitat per l'heparina a 0,75 M NaCl, vam treballar amb un tampó d'elució a una concentració de 1 M NaCl durant 6 hores. Durant tot aquest temps vam recollir fraccions per valorar-ne l'activitat lipasa. Passat aquest temps, vam augmentar la concentració del tampó a 1,1 M NaCl (Figura 55). En l'anterior plantejament, a aquesta concentració de NaCl ja vam veure un pic d'activitat i una ràpida pèrdua d'activitat (Figura 52), conseqüència de l'elució de l'LPL. Per tant, en aquest cas, el canvi de tampó també hauria de recollir tota l'LPL que encara quedés present en la columna d'heparina-Sepharose; que no hagués eluït en les 6 hores de tampó a 1 M NaCl.

Els resultats de l'elució en gradient constant a 1 M NaCl van confirmar la idea de l'elució contínua de l'LPL, ja que durant les 6 hores d'elució vam detectar activitat lipasa a les fraccions recollides (Figura 55). Tot i això, els valors d'activitat aconseguits van ser força baixos i amb un clar pic d'elució entre les fraccions 15 i 30. També, vam confirmar l'efecte que causa el canvi de tampó perquè, de la mateixa manera que va passar en l'elució en gradient esgraonat (Figura 52), vam obtenir un pic d'activitat en canviar al tampó d'elució 1,1 M NaCl.

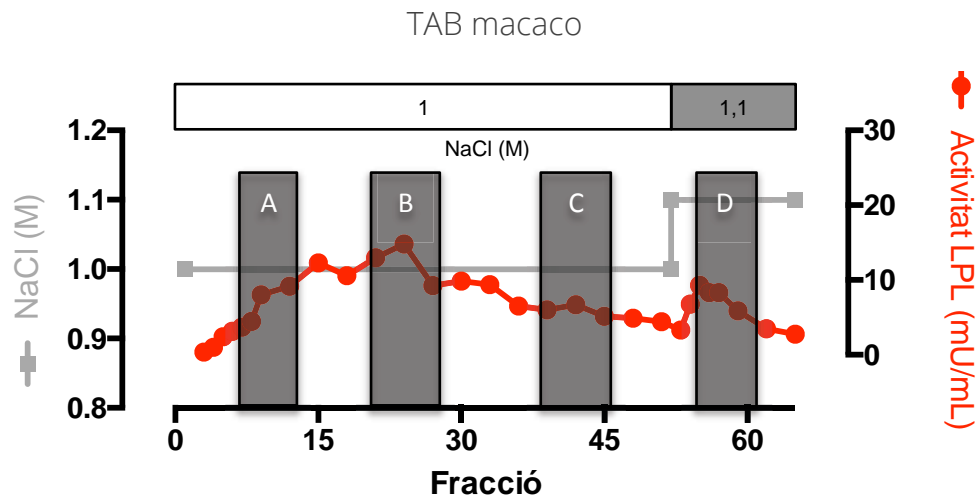


Figura 55. Purificació parcial de l'LPL de TAB visceral de macaco per cromatografia d'afinitat per gradient constant. Mostra de diversos animals (n=13) eluïda per un gradient constant de força iònica (quadrats grisos). En diferents moments de l'elució, es van escollir diverses fraccions i se'n va quantificar la l'activitat lipasa (cercles vermells). Els rectangles grisos A-D indiquen el conjunt de fraccions que es van utilitzar per a cada reserva (A-D).

A partir de la valoració d'activitat enzimàtica de les fraccions, vam generar 4 reserves d'LPL (Figura 55 – A, B, C i D). Tres d'aquestes reserves van representar diferents zones de l'elució a 1 M NaCl, ja que van incloure les fraccions 8-12 (A), 21-26 (B) i 39-46 (C). La quarta reserva va ser formada a partir de fraccions de l'eluït a 1,1 M NaCl i va incloure les fraccions 54-61 (D). Com que l'activitat enzimàtica d'aquesta purificació parcial va ser força reduïda en totes les fraccions, vam decidir no destinar volum de la reserva per analitzar les mostres per 1DE-WB, sinó directament en 2DE-WB. L'objectiu d'aquesta decisió va ser assegurar la detecció de la poca mostra de què disposàvem.

5.2.2. Anàlisi per 2DE de l'LPL

A partir de les reserves A, B, C i D (Figura 55) de la purificació parcial en gradient constant, vam fer l'anàlisi per 2DE-WB. Com en el cas de la Figura 54, l'objectiu va ser determinar si, en els diferents sectors/moments d'elució de l'LPL en aquest gradient constant a 1 M NaCl, detectàvem diferents patrons d'isoformes de pl de l'LPL.

La Figura 56 mostra els resultats de l'anàlisi en 2DE-WB de l'elució en gradient constant de l'LPL de TAB visceral de macaco. El primer punt a destacar és que va ser possible el correcte enfocament i detecció de les isoformes de pl de l'LPL en totes quatre reserves, malgrat la baixa activitat lipasa. Malauradament, en totes les reserves obtingudes de l'elució a 1 M NaCl vam detectar el mateix patró d'isoformes, pel que fa al seu pl i no a l'abundància relativa. No vam creure important valorar les diferències a nivell d'abundàncies relatives perquè l'objectiu era descriure diferències a nivell d'afinitat de les isoformes de pl per l'heparina.

En l'el·luït a 1,1 M NaCl (D) no vam poder detectar el mateix nombre d'isoformes, però les detectades van coincidir amb el patró general les isoformes més abundants de l'elució a 1 M NaCl. Aquesta diferència va ser causada, molt possiblement per la poca quantitat de proteïna perquè l'LPL ja havia eluït en gran mesura durant les 6 hores del tampó 1 M NaCl. I per tant, les mancances d'isoformes minoritàries no era degut a diferències en d'elució entre concentracions de NaCl, sinó a l'esgotament del total de proteïna.

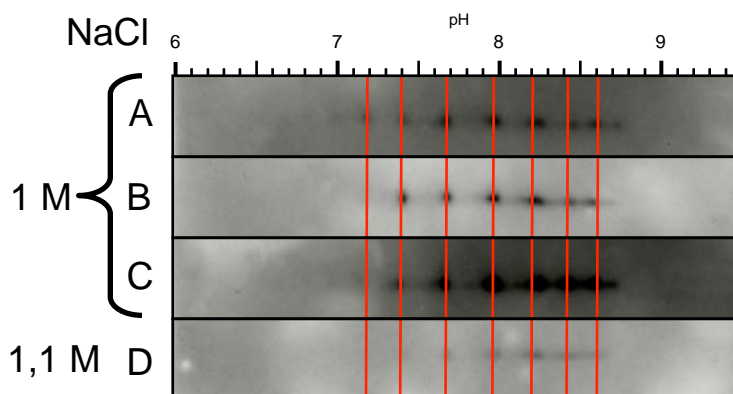


Figura 56. 2DE l'LPL de TAB visceral de macaco eluïda en gradient de NaCl constant.

Anàlisi per WB de les diferents reserves d'elució de l'LPL en tres moments de l'elució per NaCl a 1 M i 1,1M. Fraccions 8-12 (A), 21-26 (B) i 39-46 (C) i 54-61 (D) (Figura 55). Les línies vermelles marquen els pI de les isoformes.

Aquest fet ens va fer concloure que el patró d'isoformes va ser el mateix entre NaCl 1 M i 1,1 M i per tant, va confirmar els patrons obtinguts en l'elució de l'LPL en gradient de NaCl creixent i esgraonat (Figura 54).

Com que no vam detectar diferències en els patrons de pI de les isoformes de l'LPL, vam concloure que l'elució en gradient constant no afavoria l'elució diferencial de les isoformes de pI de l'LPL. Per tant, totes les isoformes tenen la mateixa afinitat per l'ancoratge i és a una concentració al voltant de 1 M NaCl quan es trenca aquesta afinitat per l'heparina.

5.3. Discussió: afinitat de les isoformes per l'heparina

Com a conclusió de les dues columnes fetes per estudiar l'afinitat per l'heparina de les isoformes de l'LPL de macaco, podem dir que el conjunt d'isoformes no presenta diferències en les seves característiques. Per tant, és impossible separar-les mitjançant la seva afinitat per l'heparina. Així, les PTM responsables de l'origen de les isoformes no generen cap diferència sobre l'afinitat per l'ancoratge.

Tanmateix sobta l'aparició d'una banda en la 1DE-WB de l'elució en gradient creixent i esgraonat en el carril 1,2 M NaCl (Figura 53). El motiu d'aquesta rellevància és perquè aquesta LPL no es veu reflectida en els diversos estudis d'altres autors en què es va treballar amb un gradient continu (Ben-Zeev et al., 2002; Bergo et al., 1996b, 1997; Wu et al., 2003), ja que en aquests treballs l'activitat i massa de l'LPL elueixen en pic. Però en el nostre cas les fraccions a 1,2

M NaCl no presenten una activitat lipasa gens elevada, però el senyal obtingut és ben clar. Per tant, podem deduir que és proteïna (massa d'LPL) no activa. Aquest protocol per eluir la mostra (2 hores per a cada tampó d'elució) el vam dissenyar perquè el temps de cada tampó garantis la completa elució de tota la proteïna de la columna. És per això que podem descartar que fos proteïna pendent d'eluir de l'anterior concentració del tampó d'elució. Per tant, no podem relacionar l'LPL detectada en elevades concentracions de NaCl (p.e. 1,2 M) dels nostres resultats amb la bibliografia present fins a dia d'avui.

Tampoc és sorprenent que les isoformes de pl no presentin diferències en l'afinitat pel substrat, en sentit fisiològic, ja que la concentració iònica en sang és un paràmetre molt regulat i que no permet grans variacions. Aquesta característica no s'hauria utilitzat per seleccionar variants en les isoformes.

A més, la seqüència de l'LPL és molt conservada, i per tant el domini d'interacció amb l'heparina també, ja que aquest domini en garanteix el correcte posicionament fisiològic i estabilitat de la proteïna. Per tant, PTM que reduïssin les cargues d'interacció amb el HSPG o heparina també reduirien la vida útil de l'enzim en la seva forma dimèrica (activa i estable).

Així, una PTM que reduís l'estabilitat de l'LPL tindria sentit com a sistema de regulació ràpida (fosforilació, nitració,...) en funció dels requeriments del teixit. Però una isoforma, el dímer de la qual des del moment de síntesi ja fos menys estable i més probablement inactiva (Bengtsson-Olivecrona and Olivecrona, 1985; Lutz et al., 2001), tindria poques possibilitat de ser descrita pel nostre sistema de purificació parcial i identificació de les isoformes, perquè únicament es purifiquen parcialment els dímers d'LPL. Aquesta característica de la purificació parcial de l'LPL pot ser una limitació en la descripció de les isoformes de pl de l'LPL, ja que no podem descriure les isoformes de l'LPL inactiva i el possible canvi en el patró de distribució respecte les isoformes actives. A més, rarament assoliria la situació fisiològicament adequada per actuar.

6. Patró d'isoformes de pl de l'LPL de rata adulta en diferents situacions fisiològiques

D'entre totes les situacions fisiològiques que causen variacions ràpides o lentes en l'activitat LPL de diferents teixits, vam decidir treballar amb el fred i el dejuni/realimentació. Vam escollir el **fred** perquè l'augment d'activitat en el TAM era una situació extrema, en què les diferències del patró demostraria quines isoformes de pl de l'LPL són afavorides en moments d'alt requeriment de lípids en el teixit. Per altra banda, el **dejuni/realimentació** destaca una situació en què en TAB es redueix dràsticament l'activitat i, seguidament ha de remuntar la mancança d'aquest enzim.

Vam descartar l'estrès com a mecanisme de regulació de l'LPL perquè provoca un alliberament de l'LPL des del teixit adipós cap al torrent sanguini (Casanovas et al., 2007; Ricart-Jane et al., 2005). Tant l'edat com l'activitat física són caràcters adaptatius a llarg termini, els quals ja els hem estudiat en el primer bloc de resultats; en aquest estudi vam centrar el nostre interès en aquelles variacions ràpides d'activitat LPL, més probablement degudes a regulació posttraduccional i no a variacions en l'expressió, que podrien determinar un canvi en el patró de les isoformes de l'LPL.

6.1. Tractaments

El primer pas va ser veure l'efecte dels diferents tractaments en els animals. Aquesta comprovació va constar d'una primera part en què vam analitzar la variació de pes dels animals. En una situació control, les rates mantenen un creixement positiu diari, pràcticament durant tota la seva vida (Berg et al., 1963). Per això, en comparar el pes total i el percentatge d'augment, vam poder determinar l'efecte dels tractaments.

6.1.1. Evolució del pes

El pes dels animals dels grups tractats, respecte el grup control, va mostrar una clara tendència a la reducció en tots els casos, tot i que només hi ha diferència significativa en el cas del dejuni (Figura 57). A més, els resultats mostren que els animals del grup control van ser els únics que van augmentar de pes durant el tractament, un 2% respecte el pes inicial; mentre que la resta de grups van patir una reducció del seu pes (Figura 57 – A). D'acord amb la bibliografia (Berg et al., 1963), el pes dels animals en una situació de confort sempre augmenta, però en situacions d'estrès, el pes no segueix aquesta tendència (Deshaies et al., 1986; Quig et al., 1983). Aquests resultats van ser el primer indicador que els diferents tractaments havien estat efectius i que l'activitat LPL dels teixits s'hauria vist modificada.

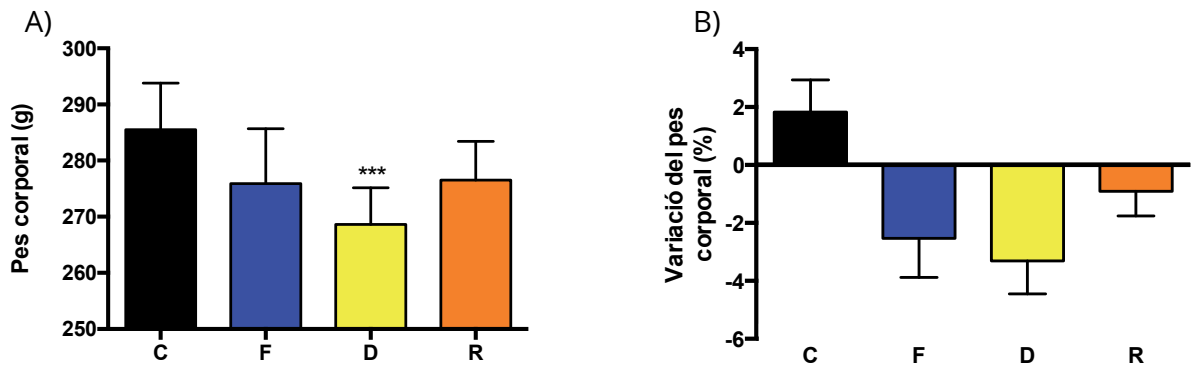


Figura 57. Pes corporal en rata després del tractament agut en tres situacions fisiològiques. A) Mitjana + desviació estàndard del pes de les rates adultes ($n=10$) en acabar el tractament: control (C), fred (F), dejuni (D) o realimentació (R) (Figura 49). Estudi fet per comparació al control o entre el dejuni i la realimentació mitjançant un test ANOVA de dades no aparellades. * vs Control. *** $P<0.001$. **B)** Mitjana \pm desviació estàndard ($n=10$) del pes dels animals en acabar el tractament respecte l'inici.

És important el fet que els animals del grup mantingut en fred també van disminuir el seu pes durant el tractament agut, malgrat disposar de menjar *ad libitum*. Van ser animals que van menjar però en menor mesura que els animals del grup control.

6.1.2. Efecte sobre l'activitat LPL

La segona part de l'anàlisi de l'efecte dels tractament va ser la valoració de l'activitat LPL dels teixits d'interès, ja que els seus valors d'activitat específica haurien de comportar-se d'acord amb el que es descriu a la bibliografia, segons cada situació fisiològica. Els resultats de la Figura 58 van mostrar l'activitat de l'LPL dels teixits estudiats de cada grup experimental. A partir d'aquests resultats vam poder comprovar si l'activitat també havia estat afectada pel tractament, a més del pes total dels animals.

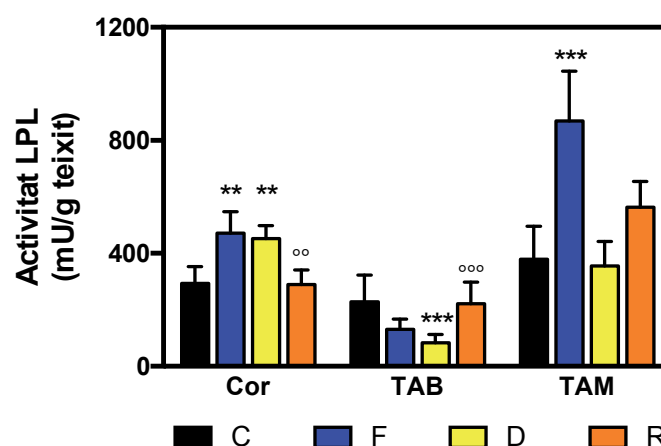


Figura 58. Activitat LPL en els teixits de rata adulta segons situació fisiològica. Mitjana + desviació estàndard ($n=10$) de l'activitat lipasa de cada teixit. Tractaments: control (C), fred (F), dejuni (D) o realimentació (R). Comparació mitjançant un test ANOVA de dades no aparellades. **/ $^{\circ}$ $P<0.01$; ***/ $^{\circ\circ}$ $P<0.001$. * vs Control; $^{\circ}$ Realimentació vs Dejuni.

En el **cor**, els animals mantinguts en fred o en dejuni van assolir valors d'activitat LPL significativament superiors al control. En la realimentació, aquest valor va reduir-se de nou fins al valor d'activitat del control i, per tant, estadísticament diferent al valor d'activitat als animals del grup dejuni.

En el **TAB**, el fred va reduir la seva activitat, però no de forma significativa. Per altra banda, el tractament de dejuni va reduir la seva activitat LPL de forma molt pronunciada. En la realimentació, de la mateixa manera com va passar en el cor, el valor d'activitat LPL es va normalitzar respecte el control.

Finalment, el **TAM** va assolir valors molt elevats en el teixit dels animals tractats en fred: el valor de l'activitat LPL en TAM en fred va ser de més del doble que la del teixit control. Aquest punt es pot afegir a les causes de pèrdua de pes en els animals del grup fred: no només van reduir la seva activitat física per no perdre calor, sinó que van augmentar el consum de lípids en el TAM per produir més calor. En dejuni, l'activitat LPL en el TAM no es va veure afectada; en canvi, en realimentació es va notar una certa tendència a augmentar, però no significativa. És curiós el diferent comportament dels teixits adiposos en el cas del dejuni, en què tot i ser un teixit adipós, el TAM no redueix la seva activitat en moments d'ingesta reduïda.

Aquests resultats van ser els esperats per confirmar que els diferents tractaments emprats van afectar l'estat fisiològic dels animals i van provocar una resposta adaptativa ràpida respecte al control, d'acord amb les experiències descrites per la bibliografia. Per tant, les variacions en el patró de les isoformes de pI de l'LPL podrien ser atribuïdes a l'adaptació a les situacions fisiològiques estudiades.

6.2. Purificació parcial de l'LPL dels teixits dels grups experimentals

Dels teixits extrets per a l'estudi dels patrons de l'LPL en diferents situacions fisiològiques (cor, TAB epididimal i TAM), vam seguir el mateix procediment de purificació de l'LPL, anàlisi en 1DE i 2DE que en els estudis fets en teixits de rata, tant adulta com cria, o macaco, tal i com s'explica als diferents apartats de materials i mètodes.

De cada teixit, hem resumit la presentació dels resultats obtinguts, agrupant la purificació parcial en heparina-*Sepharose* i l'anàlisi de la reserva (tant per 1DE com per 2DE). A més, els resultats els vam presentar segons la condició fisiològica estudiada d'acord amb el disseny experimental descrit a la Figura 49.

6.2.1. Grup Control

Tant pel cor com del TAB, vam poder desenvolupar correctament les 2DE-WB de l'LPL. En el cor (Figura 59), tot i el pic de proteïna a l'eluit i la poca intensitat del senyal en 1DE-WB, els resultats de la 2DE-WB van ser satisfactoris. En el cas del TAM (Figura 61), no va ser possible aconseguir cap imatge en 2DE. Aquest inconvenient podia haver estat degut al pic gens habitual de proteïna obtingut en

la purificació parcial de l'LPL d'aquest teixit, que feia la reserva més complexa. En estudis anteriors del TAM, tant per a teixits de rata adulta (Figura 12) com per a teixit de cria (Figura 22), no vam obtenir cap pic de proteïna total en l'elut i vam poder desenvolupar correctament l'estudi del patró de les isoformes de pI de l'LPL del TAM.

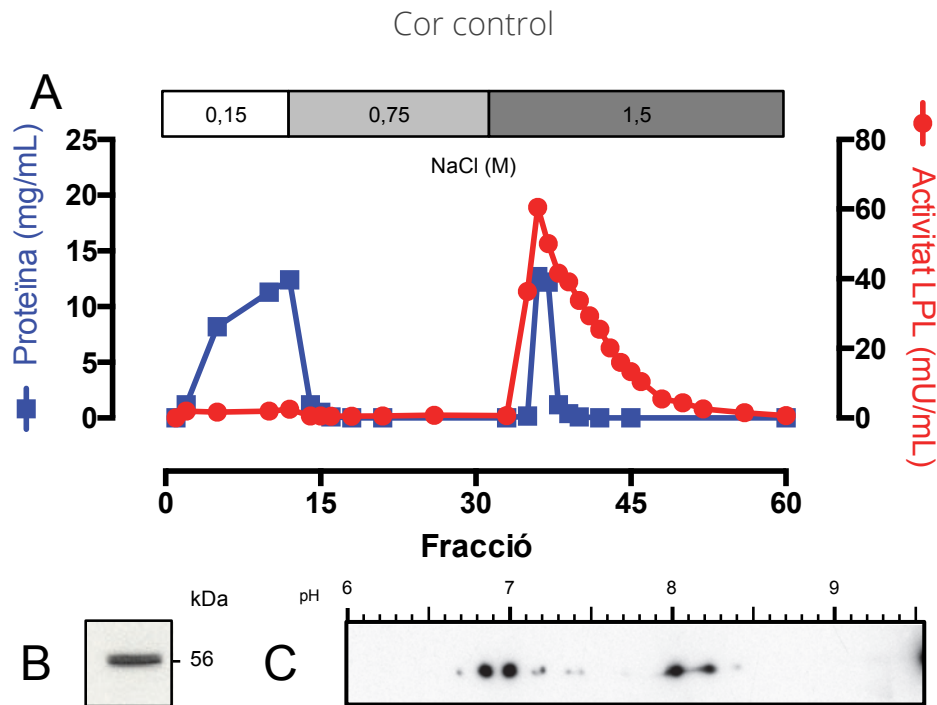


Figura 59. Isoformes de pI de l'LPL de cor de rata del grup "Control". Purificació parcial i anàlisi de l'LPL: (A) purificació parcial de l'LPL per cromatografia d'afinitat (n=10); (B) 1DE i (C) 2DE per WB de la reserva d'LPL obtinguda en (A). kDa assenyalava el pes molecular aparent de l'LPL (56 kDa).

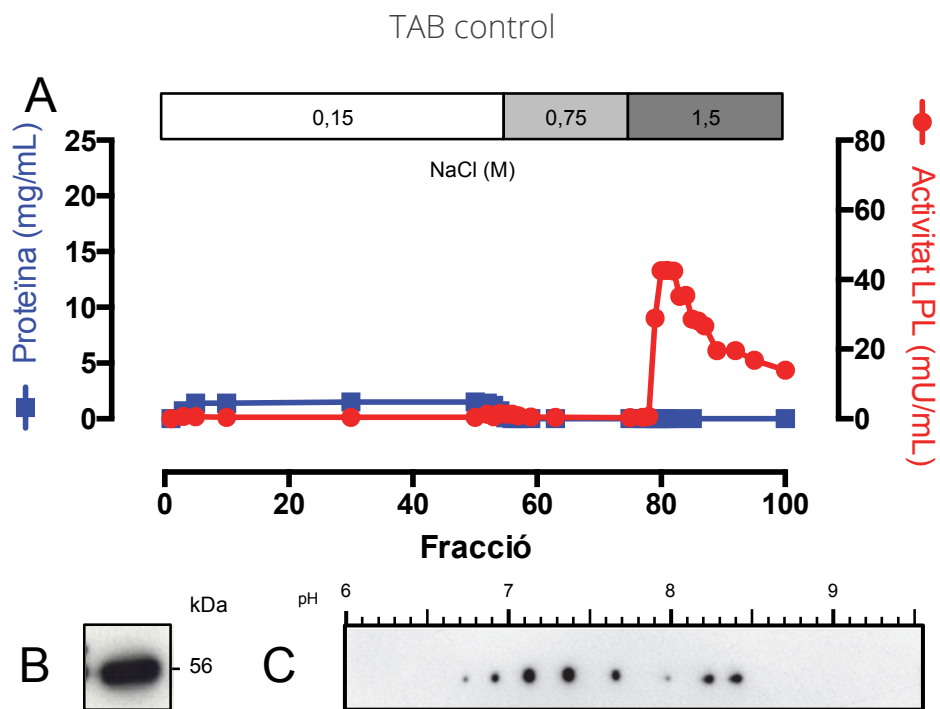


Figura 60. Isoformes de pl de l'LPL de TAB de rata del grup "Control". Purificació parcial i anàlisi de l'LPL: (A) purificació parcial de l'LPL per cromatografia d'afinitat (n=10); (B) 1DE i (C) 2DE per WB de la reserva d'LPL obtinguda en (A). kDa assenya la pes molecular aparent de l'LPL (56 kDa).

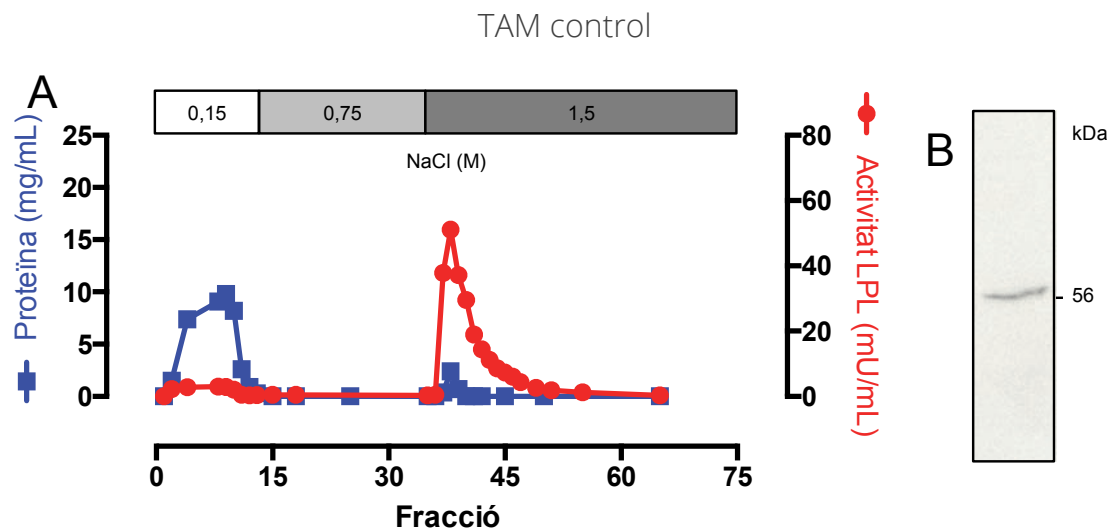


Figura 61. Isoformes de pl de l'LPL de TAM de rata del grup "Control". Purificació parcial i anàlisi de l'LPL: (A) purificació parcial de l'LPL per cromatografia d'afinitat (n=10); (B) 1DE per WB de la reserva d'LPL obtinguda en (A). kDa assenya la pes molecular aparent de l'LPL (56 kDa).

6.2.2. Grup Fred

En aquesta situació, vam poder identificar l'LPL en 2DE-WB de tots tres teixits (Figura 62, Figura 63 i Figura 64). En el cas del TAM (Figura 64), el qual presentava un elevat pic d'activitat LPL en l'el·luït a 1,5 M NaCl, també va quantificar proteïna total en algunes fraccions i es va detectar l'elevada complexitat de la mostra en la imatge obtinguda en 2DE-WB del TAM.

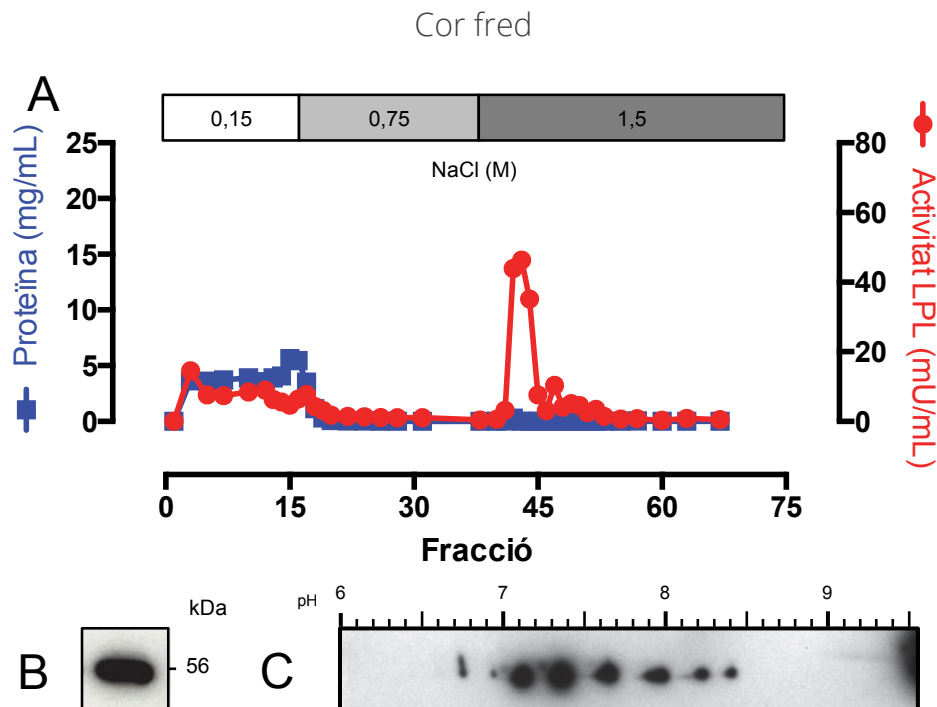


Figura 62. Isoformes de pI de l'LPL de cor de rata del grup "Fred". Purificació parcial i anàlisi de l'LPL: (A) purificació parcial de l'LPL per cromatografia d'afinitat (n=10); (B) 1DE i (C) 2DE per WB de la reserva d'LPL obtinguda en (A). kDa assenyalava el pes molecular aparent de l'LPL (56 kDa).

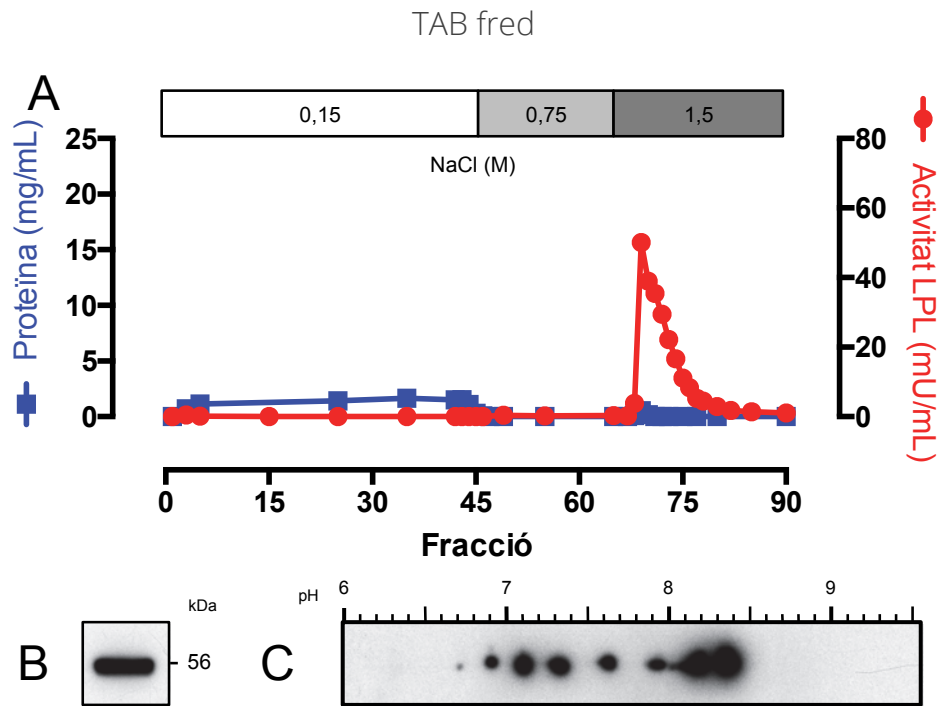


Figura 63. Isoformes de pi de l'LPL de TAB de rata del grup "Fred". Purificació parcial i anàlisi de l'LPL: (A) purificació parcial de l'LPL per cromatografia d'afinitat (n=10); (B) 1DE i (C) 2DE per WB de la reserva d'LPL obtinguda en (A). kDa assenyaleta el pes molecular aparent de l'LPL (56 kDa).

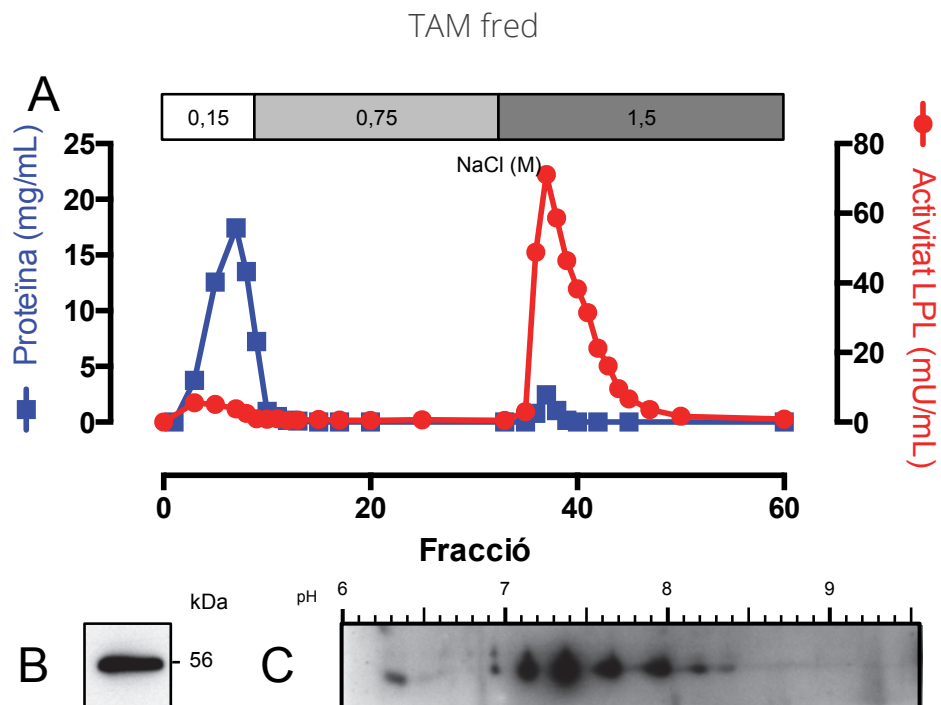


Figura 64. Isoformes de pi de l'LPL de TAM de rata del grup "Fred". Purificació parcial i anàlisi de l'LPL: (A) purificació parcial de l'LPL per cromatografia d'afinitat (n=10); (B) 1DE i (C) 2DE per WB de la reserva d'LPL obtinguda en (A). kDa assenyaleta el pes molecular aparent de l'LPL (56 kDa).

6.2.3. Grup Dejuni

Vam retirar el menjar a aquests animals 18 hores abans del sacrifici. El dejuni va ser efectiu, tal i com vam comprovar per la variació del pas corporal (Figura 57) i perquè els animals del grup de realimentació (també en 18 hores de dejuni) ràpidament van començar a menjar per compensar les hores de dejuni.

Per a la condició del dejuni també vam obtenir la imatge de la reserva en 2DE-WB per a tots tres teixits (Figura 65, Figura 66 i Figura 67). En aquesta condició fisiològica, a diferència de les dues anteriors, en l'eluït del TAM no es va detectar proteïna total en cap fracció (Figura 67).

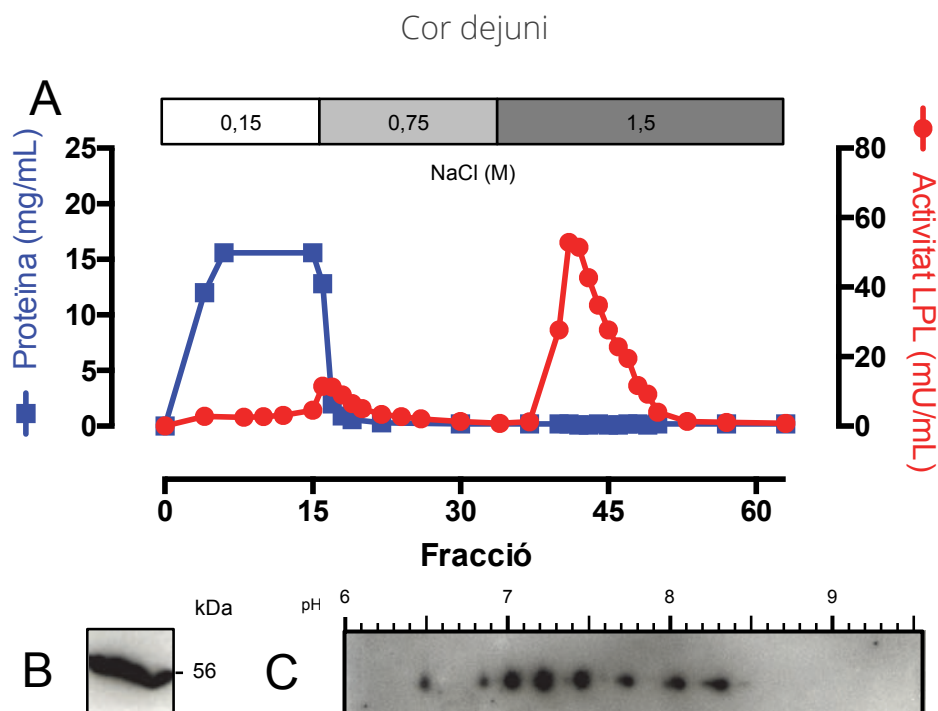


Figura 65. Isoformes de pI de l'LPL de cor de rata del grup "Dejuni". Purificació parcial i anàlisi de l'LPL: (A) purificació parcial de l'LPL per cromatografia d'afinitat (n=10); (B) 1DE i (C) 2DE per WB de la reserva d'LPL obtinguda en (A). kDa assenyalava el pes molecular aparent de l'LPL (56 kDa).

TAB dejuni

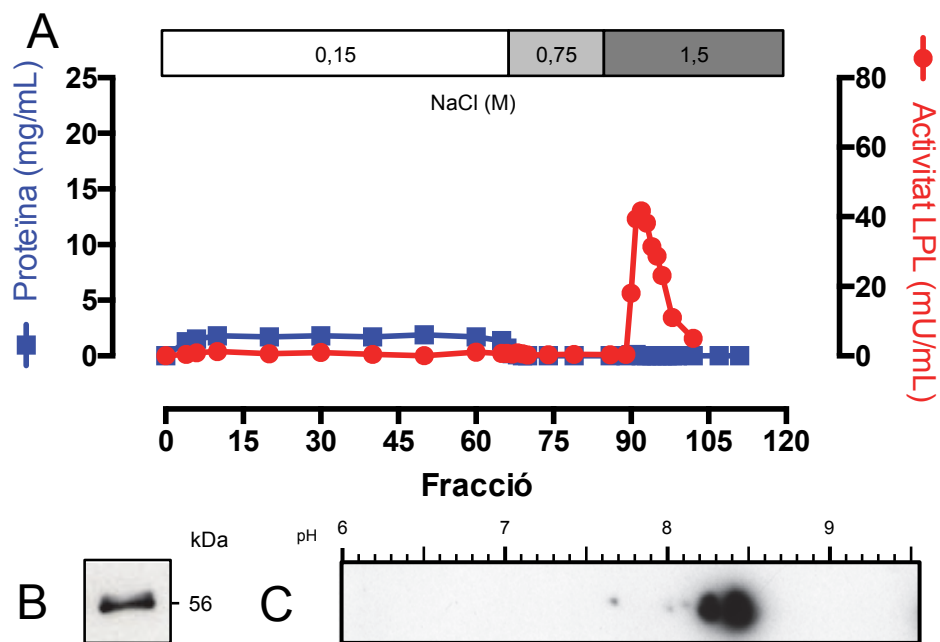


Figura 66. Isoformes de pi de l'LPL de TAB de rata del grup "Dejuni". Purificació parcial i anàlisi de l'LPL: (A) purificació parcial de l'LPL per cromatografia d'afinitat (n=10); (B) 1DE i (C) 2DE per WB de la reserva d'LPL obtinguda en (A). kDa assenya la pes molecular aparent de l'LPL (56 kDa).

TAM dejuni

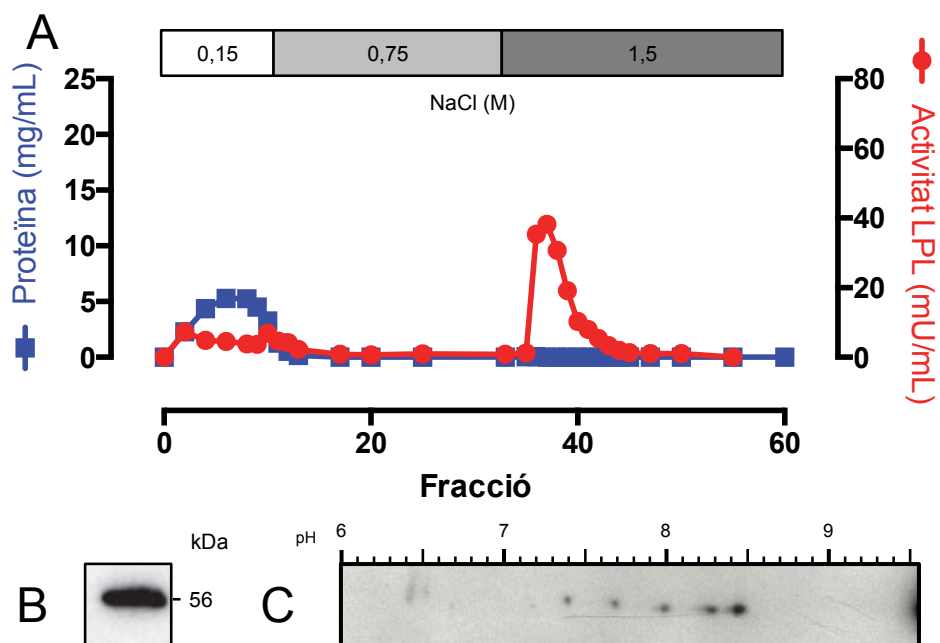


Figura 67. Isoformes de pi de l'LPL de TAM de rata del grup "Dejuni". Purificació parcial i anàlisi de l'LPL: (A) purificació parcial de l'LPL per cromatografia d'afinitat (n=10); (B) 1DE i (C) 2DE per WB de la reserva d'LPL obtinguda en (A). kDa assenya la pes molecular aparent de l'LPL (56 kDa).

Va ser sorprenent la imatge per 2DE-WB de les isoformes de l'LPL de TAB del grup dejuni (Figura 66), perquè pràcticament havien desaparegut totes les isoformes més àcides. En repetir l'assaig i confirmar aquesta distribució, vam decidir utilitzar el TAB de les rates realimentades per estudiar l'efecte de la recuperació de l'activitat LPL causada per la realimentació (Figura 58).

6.2.4. Grup Realimentació

En el cas de la realimentació, els animals també van restar sense menjar 18 hores, però els vam deixar pinso a disposició 2 hores abans del sacrifici. Únicament vam treballar amb el TAB (Figura 68). Tot i l'aparició d'un petit pic de proteïna total en l'eluit, per a aquest teixit, va ser possible l'obtenció de la imatge en 2DE-WB de les isoformes de pl de l'LPL.

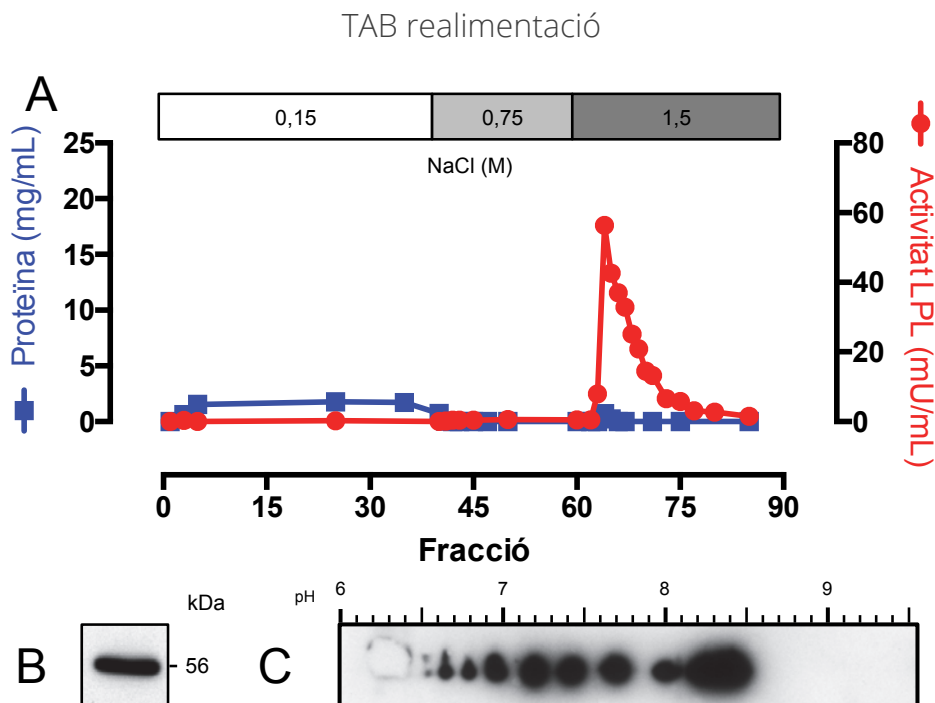


Figura 68. Isoformes de pI de l'LPL TAB de rata del grup "Realimentació". Purificació parcial i anàlisi de l'LPL: (A) purificació parcial de l'LPL per cromatografia d'afinitat (n=10); (B) 1DE i (C) 2DE per WB de la reserva d'LPL obtinguda en (A). kDa assenyalat el pes molecular aparent de l'LPL (56 kDa).

De les 10 condicions finals (3 teixits per tres situacions fisiològiques -C, F i D- més el TAB de la realimentació -R-), vam poder estudiar-ne l'LPL de 9. Únicament el TAM dels animals controls no va resoldre's correctament (Figura 61). La manca d'aquest resultat havia de ser deguda a un problema metodològic d'aquest assaig, ja que en l'apartat anteriorment desenvolupat del patró d'isoformes de l'LPL en teixits de rata adulta vam poder treballar exitosament amb aquest teixit.

6.3. Patró d'isoformes de l'LPL dels teixits dels grups experimentals

Mitjançant la metodologia explicada a l'apartat de materials i mètodes (4.1. Creació del patró d'isoformes de pl de l'LPL), vam descriure els patrons d'isoformes de pl de l'LPL en els diferents teixits de rata a partir de les imatges obtingudes de les 2DE-WB (Figura 69).

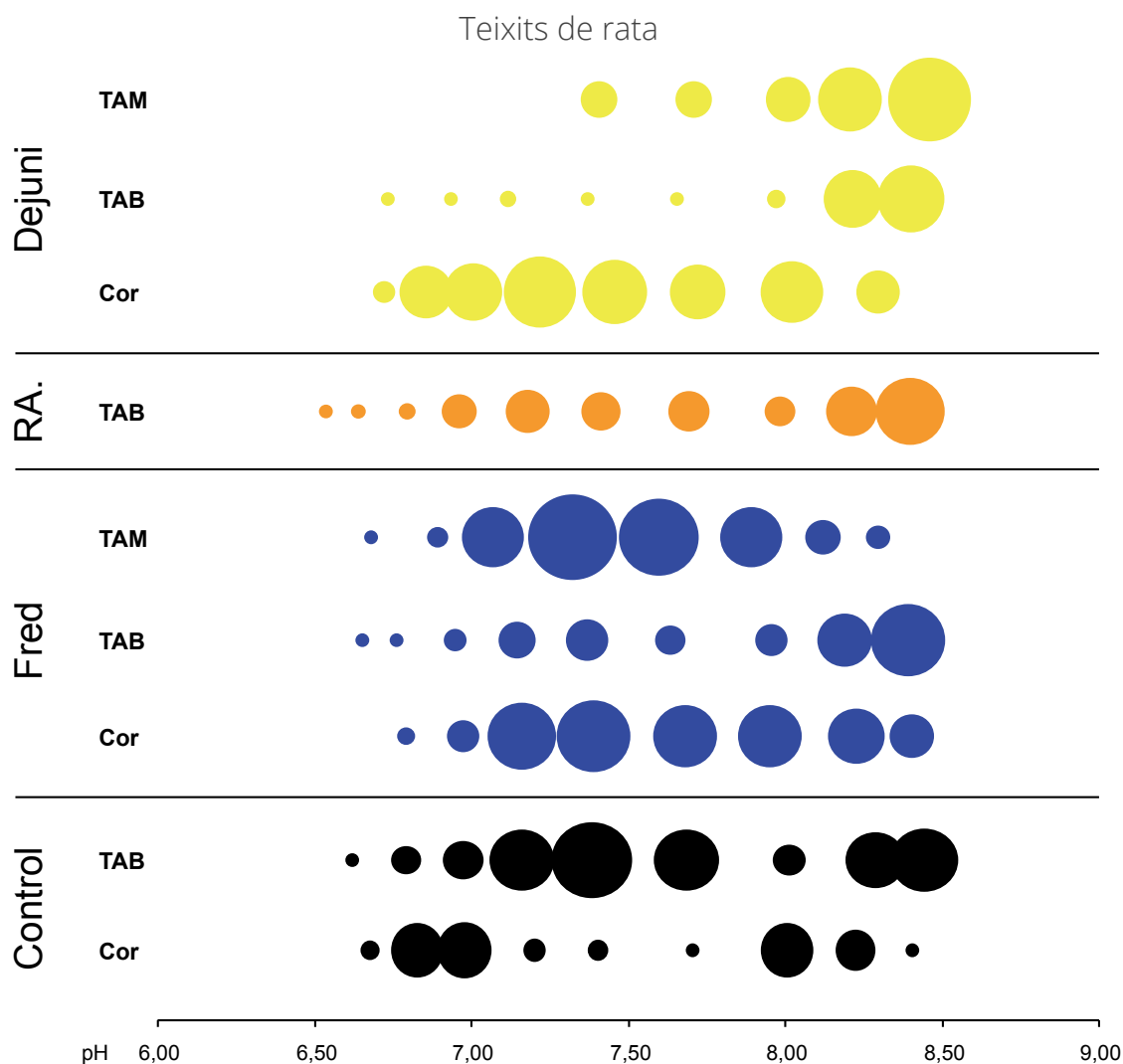


Figura 69. Patró d'isoformes de pl de l'LPL de diferents teixits de rata en diferents situacions fisiològiques. Representació de les isoformes de cor, TAB, TAM segons les mitjanes del seu pI (eix horitzontal) i de la seva abundància relativa (àrea de cada taca). Valors obtinguts a partir de diverses exposicions de cada WB en 2DE (n=2-4). Tractaments "Control" (isoformes negres), "Fred" (isoformes blaves), "Dejuni" (isoformes grogues) i "RA" (realimentació) (isoformes taronges).

En aquest estudi, no era rellevant concloure si els patrons d'isoformes de diferents teixits eren iguals o no, sinó determinar si en un mateix teixit, el patró de les isoformes variava segons la situació fisiològica en què es trobés l'animal, tant per pI com per abundància relativa.

Per això, a l'hora de fer la comparació estadística de les isoformes, vam agrupar les situacions fisiològiques per teixit (cor, TAB i TAM; Figura 70, Figura 71, Figura 72, respectivament).

Per a aquesta comparativa, en les mostres de cor i TAM control vam haver de fer servir el patró obtingut en l'estudi del patró d'isoformes de pl de l'LPL en rata adulta (Figura 16). Aquesta decisió la vam prendre pels problemes de correcte desenvolupament de les 2DE amb les mostres obtingudes de la purificació parcial de l'LPL d'aquests dos teixits en la situació control de l'estudi en diferents situacions fisiològiques, dels quals no en vam obtenir suficients replicats.

6.3.1. Estudi del pl

Tal i com vam fer en els anteriors estudis de patrons, el primer pas va ser l'estudi de l'homoscedasticitat de variàncies i la normalitat de residus dels valors obtinguts pels pl de les isoformes de l'LPL.

Pel que fa a l'homoscedasticitat, tots els teixits estudiats van resultar ser no significatius i, per tant, presentar homoscedasticitat de variàncies.

Per la normalitat de residus, també van ser tots no significatius, excepte en TAM dels animals del grup fred (p -value = 0.009039). Curiosament, aquest va ser el mateix que, en el cas de l'estudi en teixits de rata adulta, també va resultar ser significatiu pel test de normalitat de residus.

De la mateixa manera com ho vam resoldre en l'anterior estudi, aquesta vegada també vam decidir seguir amb aquesta anàlisi prospectiva. Per tant, les conclusions que se n'extraguessin havien de tenir en compte aquesta condició, sobretot en referència als resultats en què hi estigués relacionat el TAM.

El primer teixit amb què vam treballar va ser el **cor**, el qual va representar els patrons control, fred i dejuni. Segons la Figura 70, el solapament de les isoformes no va incloure totes dues situacions fisiològiques: els valors dels intervals entre el patró del control i del dejuni pràcticament no van coincidir. Per altra banda, el patró del fred es va solapar de forma molt coincident amb les isoformes del patró control. Per tant, respecte el control, el patró d'isoformes de pl de l'LPL de cor de rata en dejuni segueix un patró diferent pel que fa a pl, mentre que el patró del fred es manté constant.

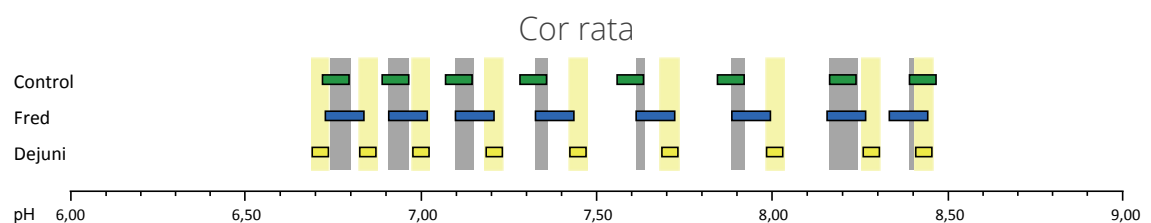


Figura 70. Solapament dels intervals de confiança de les isoformes de pl de l'LPL de cor de rata en diferents situacions fisiològiques. Representació dels intervals de pH de cada isoforma d'LPL de cor dels diferents grups experimentals. Els rectangles verticals de color gris indiquen coincidència de les distribucions del control i del fred; els rectangles verticals de color groc són la distribució del dejuni.

Els resultats del **TAB** van mostrar un solapament dels patrons en totes tres situacions fisiològiques respecte el control (Figura 71). Tanmateix, en alguna de les isoformes, la coincidència va ser molt justa. Tot i aquest solapament tan just, la conclusió és que en el TAB els pI de les isoformes es manté sempre constant, encara que algunes isoformes puguin arribar a desaparèixer. A més, les isoformes que desapareixen són les de menor abundància relativa (Figura 69).

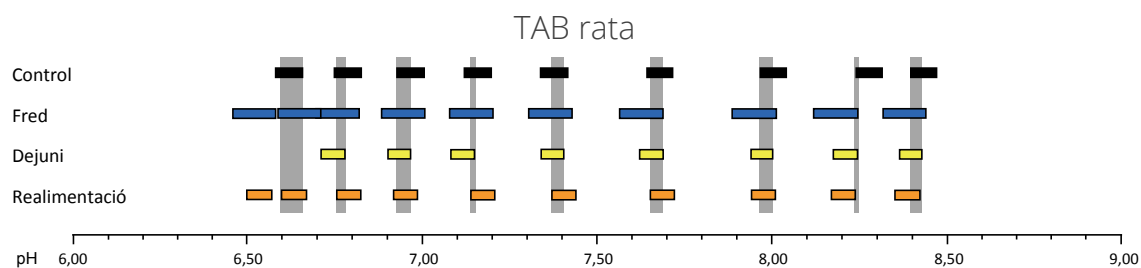


Figura 71. Solapament dels intervals de confiança de les isoformes de pI de l'LPL de TAB de rata en diferents situacions fisiològiques. Representació dels intervals de pH de cada isoforma d'LPL de TAB dels diferents grups experimentals. Els rectangles verticals de color gris indiquen la coincidència de l'interval entre totes les situacions fisiològiques.

Pel **TAM**, tal i com mostra la Figura 72, el solapament entre el patró del control i el patró del fred va ser molt minoritari. I no prou amb l'escàs solapament, també diverses isoformes van quedar desaparellades, conseqüència del diferent nombre d'isoformes de cada situació. La conjunció d'aquests dos aspectes del solapament va dur a la conclusió que les isoformes del TAM no se solapen.

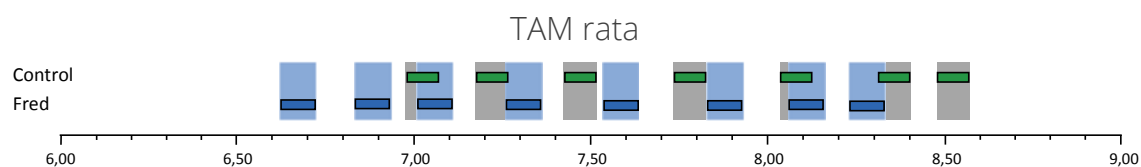


Figura 72. Solapament dels intervals de confiança de les isoformes de pI de l'LPL de TAM de rata en diferents situacions fisiològiques. Representació dels intervals de pH de cada isoforma d'LPL de TAM dels diferents grups experimentals. Els rectangles verticals de color gris indiquen l'interval de les isoformes del control i els de color blau, del fred.

DIGE

En el cas del patró d'isoformes de pI de l'LPL en **TAB de rata**, els resultats de les 2DE-WB (prèviament a la quantificació) van evidenciar que les abundàncies relatives de les isoformes entre les diferents situacions fisiològiques variaven molt, fins al punt de desaparèixer algunes isoformes (Figura 69). Aquestes **variacions** són prou importants per detectar-les abans de fer l'anàlisi de l'abundància relativa. Una vegada vam descriure que el pI de les isoformes del TAB en les diferents condicions no variava (Figura 71), el resultat de l'abundància relativa prenia més

rellevància, ja que, per exemple, hi havia una clara pèrdua d'abundància en les isoformes més àcides en favor de les més bàsiques, en el cas del dejuni. Aquests resultats implicaven que el teixit modificava les proporcions de cada isoforma en funció de la situació fisiològica en què es trobava; però mantenia el mateix tipus d'isoforma. Aquesta fet va divergir, per exemple, en el cas del **cor**, que davant un augment d'activitat LPL com a mecanisme d'adaptació a una nova situació fisiològica (Figura 58), la variació del patró d'isoformes va seguir respostes diferents (Figura 70).

Per aquest motiu, l'anàlisi del solapament de les isoformes de pl del TAB el vam confirmar per una segona metodologia: el DIGE (veure 2.7. Gel diferencial d'electroforesi 2DE (DIGE), de material i mètodes). Breument, aquest mètode identifica amb diferents fluoròfors les proteïnes de cada mostra. A continuació, es realitza una 2DE amb el conjunt de mostres juntes. Finalment, s'identifiquen les diferents mostres en el mateix gel mitjançant els diferents fluoròfors. Així, es poden determinar similituds o diferències sobre la distribució del total de proteïnes entre les diferents mostres.

Vam tractar les diferents reserves de l'LPL obtingudes en les purificacions parcials del TAB: control, fred, dejuni i realimentació. Per limitacions de l'assaig, vam fer dues agrupacions de les mostres:

- La primera va incloure les reserves del grup fred i el control (Figura 73).
- La segona va incloure les reserves del dejuni, la realimentació i el control (Figura 74).

La primera impressió dels resultats del DIGE va ser que la resolució de la tècnica 2DE no es va veure afectada pel tractament previ de la mostra i del sistema de revelat: els punts revelats al gel van estar ben definits. Pel que fa al resultat del DIGE, en totes dues imatges (Figura 73 i Figura 74) va ser fàcilment identificable les isoformes de l'LPL, en el seu pes i interval de pH corresponent. A més, es va assolir una complexitat d'imatges molt diferent segons el tractament; aquesta diferència de la complexitat va garantir que no s'hagués creuat el marcatge amb el fluoròfor entre les dues mostres, i per tant, que el patró coincidís per contaminació creuada.

Pel que fa al solapament de l'LPL del fred (Figura 73), en la imatge de comparació de les dues situacions fisiològiques vam veure com diferents punts apareixen de color groc: són el resultat de la coincidència entre el control i el fred. L'aparent elevada complexitat de la mostra del fred no va dificultar la identificació de l'LPL.

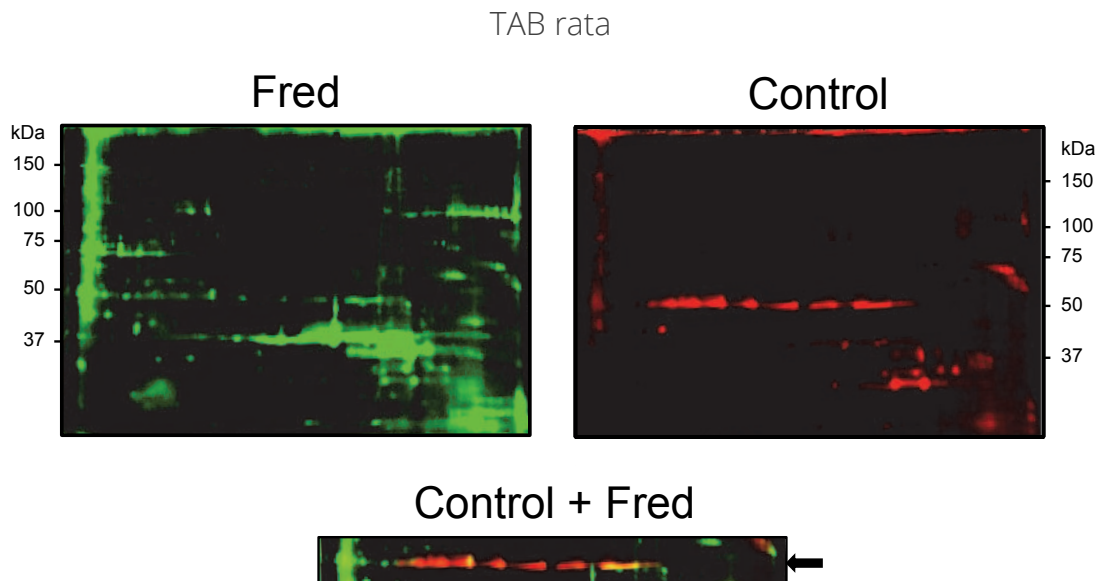


Figura 73. 2DE de l'LPL de TAB de rata en diferents situacions fisiològiques. Reserva de la purificació parcial dels TAB dels animals control i dels fred, tractada per a DIGE, enfocada en tires d'IEF de pH 6-11 en 11 cm i revelada per escàner de fluorescència. Fins a 300 µg de proteïna total. Comparació dels pI de les isoformes d'LPL en les diferents situacions (Control+fred): el color groc indica co-localització de proteïnes de la situació control (color vermell) i de la situació fred (color verd). kDa és el marcador de pes molecular aparent. La fletxa indica el pes molecular aparent de l'LPL (56 kDa).

El segon assaig del DIGE, va incloure les mostres de control, dejuni i realimentació. En aquest cas, també vam aconseguir una elevada resolució i en totes les circumstàncies vam poder detectar a simple vista el patró de l'LPL (Figura 74). Una vegada fet el solapament de les imatges obtingudes, vam veure que en qualsevol condició fisiològica, el patró d'isoformes de pI de l'LPL es mantenia amb els mateixos valors de pI.

Aquests resultats, a més d'assegurar que la metodologia aplicada en l'assignació de valors del pI i abundància relativa va ser correcta, també ens va confirmar que el patró d'isoformes de l'LPL de TAB de rata adulta manté el mateix pI en diferents situacions fisiològiques. I per tant, va prendre major rellevància la comparació dels percentatges de distribució relativa.

TAB rata

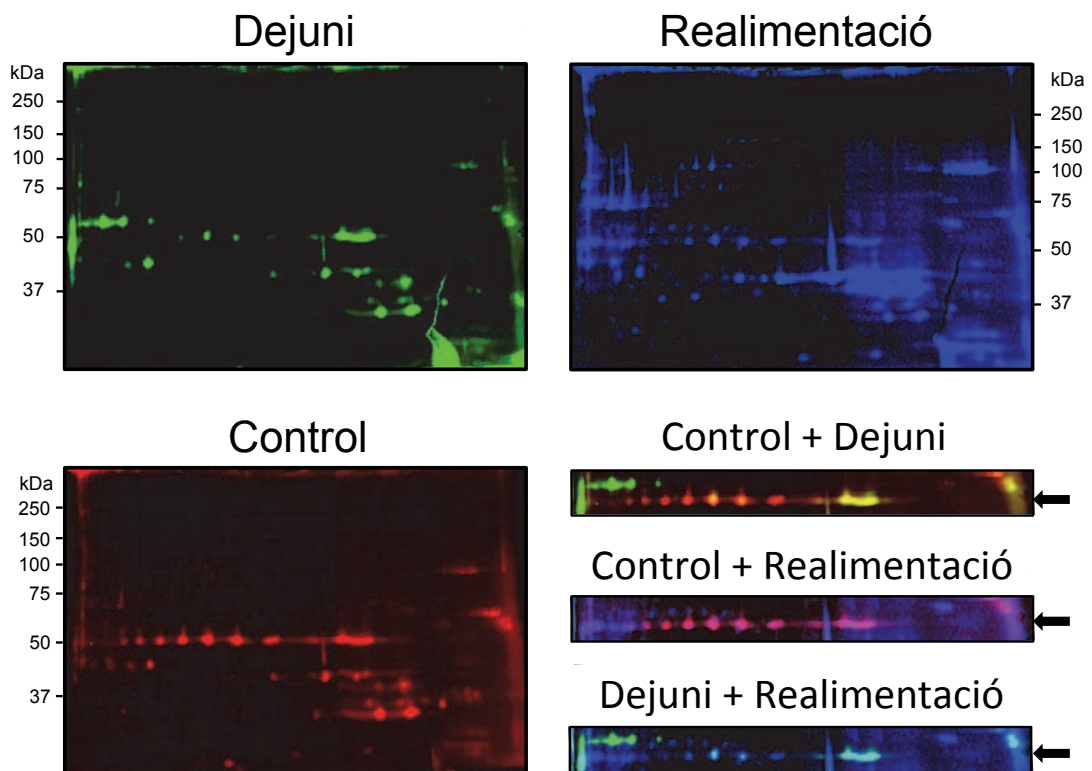


Figura 74. 2DE de l'LPL de TAB de rata en diferents situacions fisiològiques. Reserva de la purificació parcial dels TAB control, dejuni i realimentació, tractada per a DIGE, enfocada en tires d'IEF de pH 6-11 en 11 cm i revelada per escàner de fluorescència. Fins a 300 µg de proteïna total. Comparació dels pI de les isoformes d'LPL en les diferents situacions: el color groc, rosa o turquesa indiquen co-localització de proteïnes de la situació control (color vermell), dejuni (color verd) o realimentació (color blau). kDa és el marcador de pes molecular aparent. La fletxa indica el pes molecular aparent de l'LPL (56 kDa).

6.3.2. Estudi de l'abundància relativa

Una vegada comparats els intervals de distribució dels pI de cada isoforma dels diferents teixits en diferents situacions fisiològiques, vam analitzar la distribució de l'abundància de les isoformes. Per a aquesta anàlisi, era necessari que els intervals de pH de les isoformes de diferents situacions fisiològiques se solapessin. Així, a partir dels resultats de la comparació dels pI (Figura 70, Figura 71 i Figura 72), vam concloure que es podia comparar l'abundància relativa únicament de:

- el patró del cor en fred respecte el control (Figura 75).
- el patró del TAB en fred, dejuni i realimentades respecte el control (Figura 76).

Els resultats de la comparació de les abundàncies relatives de les isoformes de pI de l'LPL de **cor** de rata en situació de fred, respecte el control (Figura 75), van mostrar que totes les isoformes excepció d'una van variar la seva abundància

relativa. L'abundància de les isoformes dels animals en una situació de fred va desplaçar-se cap a uns pH més bàsics. En la Figura 75 es veu com els animals control van concentrar la majoria de l'abundància entre la segona i quarta isoforma; però els animals en fred van repartir l'abundància entre les isoformes 3 a 7 (entre un 15% i un 22%).

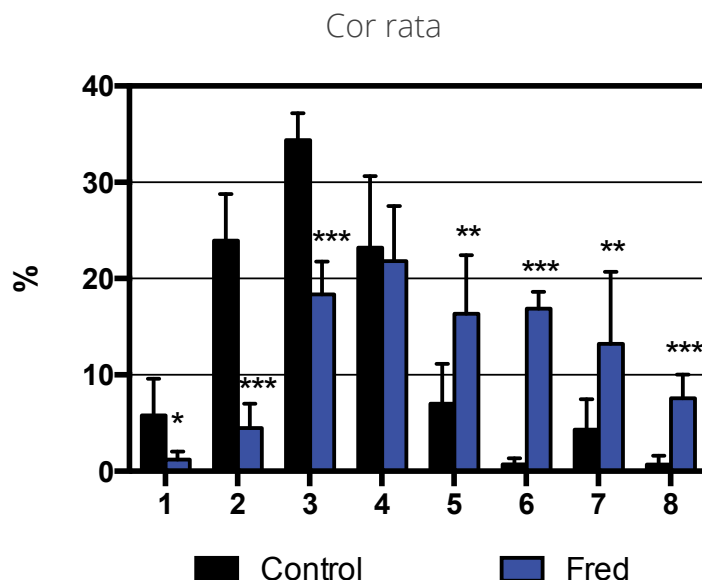


Figura 75. Comparació de l'abundància relativa de cada isoforma de pI de l'LPL de cor de rata adulta en diferents situacions fisiològiques. Resultats expressats com a mitjana + desviació estàndard. Comparació de l'abundància relativa de les isoformes de pI de l'LPL (1-8) entre cada situació fisiològica per un test T-student de dades no aparellades. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. La isoforma 1 correspon al pI més àcid i la isoforma 8 al pI més bàsic.

En el cas del **TAB** (Figura 76), els resultats del fred també van mostrar una tendència a generació d'isoformes de pI més bàsic que el control. Tanmateix, va ser l'LPL dels animals en dejú la que més va divergir del control: només la isoforma 8 no va ser significativament diferent, però tota la resta van presentar elevada diferència de percentatge d'abundància respecte el control ($P < 0,01$ o $P < 0,001$). En els resultats del patró (Figura 69) de cada situació ja es va intuir una elevada tendència cap a les isoformes més bàsiques. Els resultats del patró dels animals en realimentació van marcar una tendència a la recuperació dels percentatges de distribució dels patró control, ja que:

- La realimentació també va presentar una elevada divergència respecte del dejuni (9 de les 10 isoformes van presentar valors d'abundància relativa significativament diferents al patró del dejuni).
- La realimentació només va presentar 3 de les 10 isoformes amb percentatges d'abundància relativa significativament diferents al patró del control. Aquestes 3 isoformes (números 6, 7 i 10 de la Figura 76) tenen valors d'abundància que es van situar entre el control i el dejuni.

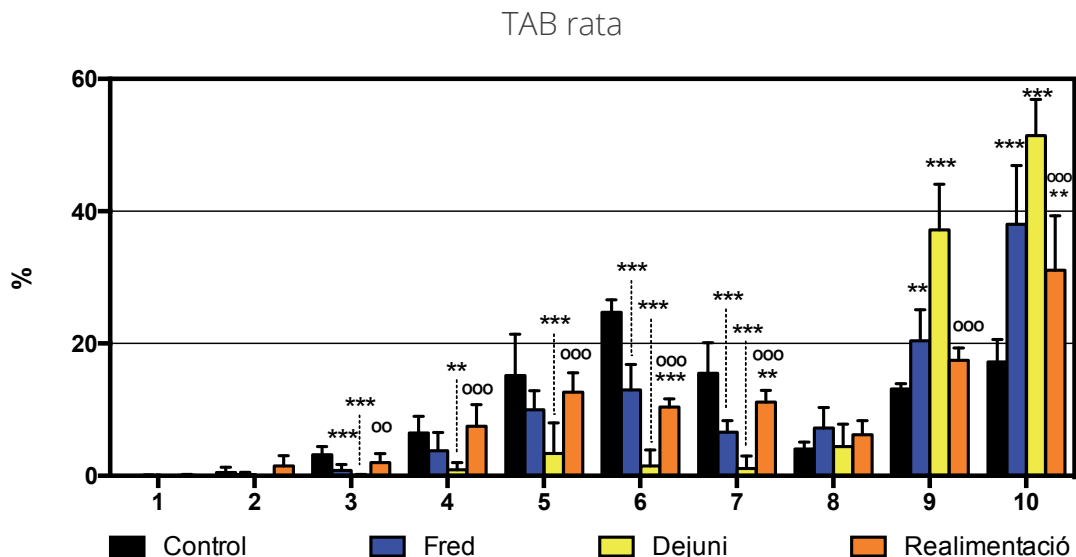


Figura 76. Comparació de l'abundància relativa de cada isoforma de pl de l'LPL de TAB de rata adulta en diferents situacions fisiològiques. Resultats expressats com a mitjana + desviació estàndard. Comparació de l'abundància relativa de les isoformes de pl de l'LPL (1-10) entre cada situació fisiològica per un test ANOVA de dades no aparellades. * $P < 0.05$; **/°° $P < 0.01$; ***/°°° $P < 0.001$. * vs Control; ° vs Dejni.

Com a conclusió d'aquest estudi d'abundància relativa en el TAB, val la pena destacar que tant el fred com el dejuni, una caiguda de l'activitat LPL en aquest teixit (Figura 58 i Figura 71), impliquen un augment de les isoformes de pl més bàsics. Així, aquestes isoformes podrien ser un reservori d'isoformes menys actives (o inactives) a fi de regular de forma ràpida l'activitat específica del teixit. Per això, en menys de dues hores, el TAB en realimentació és capaç de presentar un patró de distribució d'isoformes a mig camí entre el patró del dejuni i del control. Aquestes isoformes que augmenten en el teixit realimentat, han de ser degudes a regulació posttraduccional, ja que la síntesi de nova proteïna és impossible en un interval de temps tan curt. En el cor el comportament de la distribució també es descriu per un augment de les isoformes de pl més bàsic. Però l'activitat LPL en aquesta situació va augmentar respecte del control (Figura 58).

Per tant, una mateixa situació fisiològica causa una resposta oposada en el cor i en TAB, però la tendència en la variació dels percentatges és la mateixa.

6.4. Activitat enzimàtica de les isoformes de pl de l'LPL de TAB en dejuni

Arran de les conclusions extretes de la comparació dels patrons de distribució de les isoformes en diferents situacions fisiològiques, vam plantejar la hipòtesi que les isoformes més bàsiques fossin variacions amb menor activitat lipasa o sense. Això justificaria l'augment relatiu d'aquestes isoformes en situacions de caiguda de l'activitat específica del teixit, a més dels darrers resultats de la regulació ràpida de l'LPL per PTM (Kroupa et al., 2012; Ruge et al., 2004).

Per resoldre aquesta hipòtesi, vam tornar a aplicar la metodologia del substrat suïcida en mostres obtingudes de TAB de rata adulta en dejuni i rates controls (Figura 77). Així, les isoformes de pI més bàsic del TAB en dejuni no s'haurien de poder detectar o haurien de tenir molt menor intensitat respecte del control, per falta de la sonda unida a l'enzim.

En la incubació del TAB de rata en situació control es va localitzar clarament les isoformes de pI de l'LPL en l'interval de pH corresponent (entre pH 6,5 i 8,5) i el pes molecular aparent esperat (56 kDa). En el control, vam detectar fins a 8 isoformes, de les quals les més intenses són al voltant de pH 7-7,5. Així, en TAB de rata control totes les isoformes presenten activitat lipasa per igual. Aquest resultat es correspon amb l'obtingut en l'LPL de macaco (Figura 50), el qual conclouia que totes les isoformes de pI de l'LPL són actives.

En el cas del macaco, també va aparèixer una lipasa de menor pes molecular que l'LPL i amb un pI proper a 6,5 (Figura 50). En el resultat de les rates dejunades, de nou, vam detectar la lipasa de menor pes molecular i pI 6,5 (Figura 77). Aquesta lipasa diferent de l'LPL, la qual va assolir una intensitat similar en tots dos experiments, es va poder fer servir com a control intern de l'assaig: com que la intensitat d'aquesta altra proteïna és molt similar en tots dos assajos, vam poder comparar la intensitat de l'LPL en les diferents situacions fisiològiques.

Pel que fa a l'LPL del TAB dels animals en dejuni incubat amb substrat suïcida (Figura 77), també vam poder detectar les isoformes de pI de l'LPL; però les isoformes van presentar una intensitat molt menor a l'aconseguida en el TAB control. En el TAB dels animals mantinguts en dejuni, l'interval de distribució també va ser des de pH 6,5 fins a 8,5 aproximadament, però les isoformes amb més intensitat van ser les de major pI. El total d'isoformes detectades va ser de 8. Curiosament, la lipasa de menor pes molecular també es va detectar molt clarament, amb una intensitat similar a l'assolida en l'assaig del TAB control. Tanmateix, per poder utilitzar aquesta lipasa desconeguda com a control intern, hem de suposar que el dejuni no n'afecta la seva expressió en TAB.

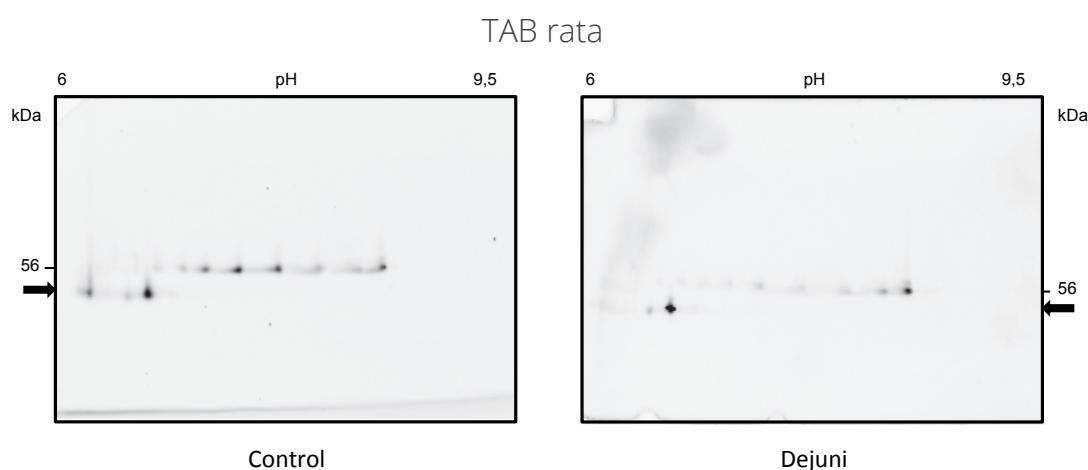


Figura 77. 2DE de TAB epididimal de rata. Reserves d'LPL de TAB control i dejuni purificades parcialment per cromatografia d'afinitat, incubades amb substrat suïcida de lipases, enfocada en tires d'IEF de pH 6-11 en 11 cm i revelada per escàner de fluorescència. Fins a 300 µg de proteïna total. kDa assenyalen el pes molecular aparent de l'LPL (56 kDa). La fletxa indica altres lipases revelades per 2DE-DABGE.

La conclusió de la hipòtesi sobre l'activitat de les isoformes de pl més bàsic del TAB de rata, és que són igualment actives que les altres. A més, la seva activitat no es veu afectada pels mecanismes de regulació de l'activitat enzimàtica del TAB en situació de dejuni.

Així, com a conclusions de l'efecte de canvis fisiològics sobre el patró d'isoformes de l'LPL, podem dir que:

- a) el patró del **cor** es veu afectat de diferent forma segons si parlem de dejuni (que afecta els pl de les isoformes) o del fred (que manté els pl però varia significativament les abundàncies relatives cap a pH més bàsics).
- b) el patró del **TAB** es manté constant pel pl en totes tres situacions. Però hem detectat una important tendència a augmentar les isoformes més bàsiques quan el teixit redueix la seva activitat lipasa. Tot i tenir menor activitat en el teixit, les isoformes bàsiques són igualment actives.
- c) En el **TAM**, el patró de pl de les isoformes es veu profundament modificat en una situació d'estrès per fred. En tenir un patró de pl de les isoformes que no se solapa entre situacions, ja no es pot comparar l'abundància relativa.

Les conclusions obtingudes a partir dels resultats són molt diverses en funció del teixit del qual es parli. Hem comprovat que una mateixa resposta a un mateix estrès té diferents respostes pel que fa al patró d'isoformes de pl de l'LPL. Per exemplificar-ho, podem comparar la resposta al fred del cor i del TAM (Figura 70 i Figura 72, respectivament): en tots dos casos, el teixit augmenta la seva activitat lipasa (Figura 58), però mentre que en el TAM els pl de les isoformes no es mantenen, els del cor són els mateixos.

6.5. Caracterització en poblacions de les isoformes de pl de l'LPL de rata

A partir de totes les dades recopilades en l'estudi de les isoformes (pl i abundància relativa) i amb la manca de models d'anàlisi de patrons estadísticament definits, ens vam plantejar la possibilitat de caracteritzar la distribució de totes les isoformes de tots els teixits i situacions fisiològiques en funció dels paràmetres pl i abundància relativa. D'aquesta manera, podríem definir poblacions (o clústers) d'isoformes i descriure tendències en la variació de la població en funció del teixit, de l'edat o de la condició fisiològica.

6.5.1. Gestió de dades

Per a l'anàlisi descriptiva vam utilitzar estadístiques resum:

- Variables contínues: mitjana, desviació típica, valors mínim i màxim, mediana i percentils 25 i 75.
- Variables categòriques: freqüències i percentatges.

L'anàlisi gràfica va consistir de diagrames de barres i box-plots. Per a l'anàlisi exploratori dels grups vam aplicar tècniques estadístiques no supervisades de partició (anàlisi de clústers), utilitzant les variables "punt isoelèctric", "abundància relativa" i "tipus de teixit", en un model jerarquitzat (mètode del veí més llunyà). Totes les correlacions entre variables van ser inferiors a 0.2. Finalment vam fer una anàlisi descriptiva classificant les isoformes per a cada grup. A cadascun dels grups identificats per l'anàlisi, els vam anomenar **clúster**.

6.5.2. Anàlisi descriptiu de les variables

Estudi del pl de les isoformes

La descripció de la distribució dels valors de pl de segons cada teixit es recull a la Taula 5. En aquesta recopilació va ser necessari treballar amb tots els valors de les isoformes obtinguts en el capítols de Distribució de les isoformes de pl de l'LPL (rata adulta i de cria) i de Funció de les isoformes de pl de l'LPL (diferents condicions fisiològiques).

Teixit	pl							
	N	Mitjana	DT	Mínim	P25	Mediana	P75	Màxim
Cor	44	7.48	0.61	6.51	6.95	7.39	8.01	8.44
TAB	47	7.44	0.64	6.52	6.83	7.37	8.01	8.51
TAM	27	7.71	0.54	6.68	7.22	7.72	8.20	8.53
Múscul	9	7.51	0.63	6.70	7.01	7.43	8.02	8.45
Tots	127	7.51	0.61	6.51	6.97	7.43	8.08	8.53

Taula 5. Descripció de la distribució de pl de les isoformes de l'LPL. Per a cadascun dels quatre teixits estudiats en rata (cor, TAB, TAM i múscul), valors de la mitjana, desviació típica (DT), mediana i els percentils dels valors de pl de les isoformes de l'LPL (n=127).

A partir de les dades obtingues, vam poder representar la distribució dels pl segons cada teixit (Figura 78).

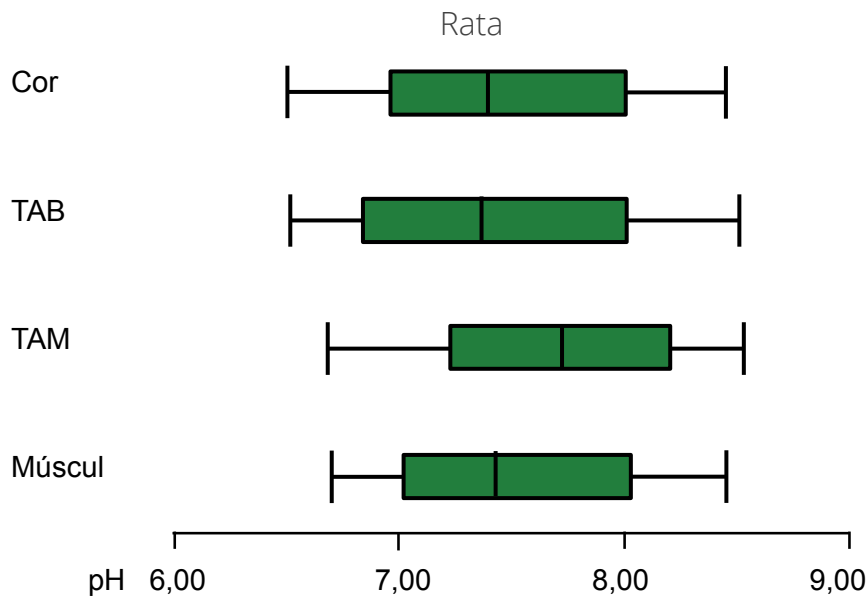


Figura 78. Distribució dels pI de les isoformes de l'LPL. Representació en box-plot de la mediana i els percentils de distribució de les isoformes, per a cada teixit estudiat (cor, TAB, TAM i múscul), segons les dades de la **Taula 5**.

A partir de la Taula 5 i la Figura 78 es pot confirmar la distribució de qualsevol isoforma de l'LPL: des **de 6,51 fins a 8,53**. En aquest interval de pH s'inclouen totes les isoformes de rata descrites fins al moment (adult, cria i diferents condicions fisiològiques).

Aquests resultats són coherents amb els ja obtinguts en el capítol de distribució, en la Figura 16 i la Figura 23, on es descriuen els intervals de distribució de les isoformes de l'LPL en rata adulta i cria, respectivament. Per tant, hem demostrat que les diferents variacions d'activitat causades per les diferents condicions fisiològiques (Figura 58) causen petites variacions en la distribució i abundància relativa de les isoformes, i que no alteren de forma significativa l'interval global de distribució.

Estudi de l'abundància relativa de les isoformes

La Taula 6 mostra la mitjana, desviació típica, valors mínim i màxim, mediana i percentils 25 i 75 de les abundàncies relatives per a les isoformes de cada teixit estudiat. A partir d'aquesta informació, vam representar els mateixos valors en la Figura 79.

Per a aquest aspecte de les isoformes (l'abundància relativa), a diferència del pI, destaca l'elevada dispersió de resultats (gran diferència entre els valors extrems i els percentils 25 i 75), però únicament en cor, TAB i TAM. El múscul manté una dispersió força més reduïda que els altres tres teixits. Aquest fet es pot justificar perquè el múscul no es va incloure a l'estudi del patró d'isoformes en diferents condicions fisiològiques.

També és destacable que en tots els teixits existeixen isoformes de molt baixa abundància relativa (0,03 ~ 1,29%). Però en canvi, l'abundància màxima depèn molt de cada teixit (21,31 ~ 51,48%).

Teixit	Abundància relativa (%)							
	N	Mitjana	DT	Mínim	P25	Mediana	P75	Màxim
Cor	44	11.37	9.39	0.10	2.49	9.97	18.48	34.37
TAB	47	10.64	11.84	0.03	1.50	6.58	15.16	51.48
TAM	27	14.82	12.19	0.23	2.69	10.90	25.47	43.94
Múscul	9	11.11	7.70	1.29	5.27	10.47	17.65	21.31
Tots	127	11.81	10.88	0.03	2.02	9.03	18.39	51.48

Taula 6. Descripció de la distribució de l'abundància relativa de les isoformes de l'LPL. Per a cadascun dels quatre teixits estudiats en rata (cor, TAB, TAM i múscul), valors de la mitjana, desviació típica (DT), mediana i els percentils dels valors de pl de les isoformes de l'LPL (n=127).

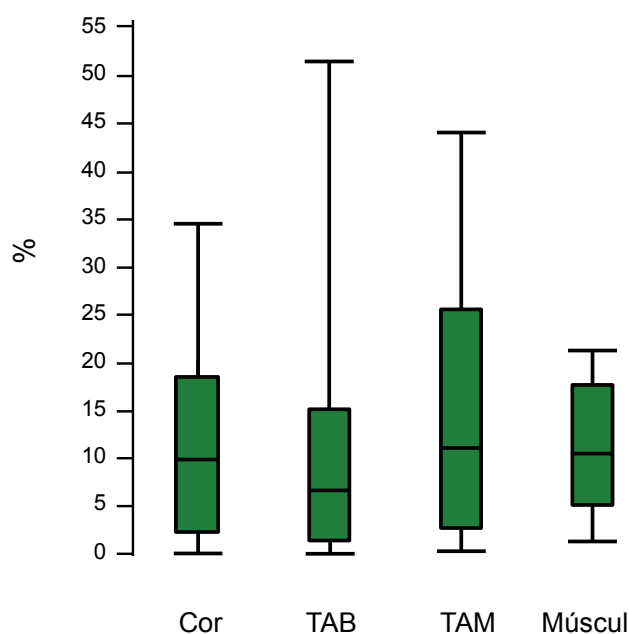


Figura 79. Distribució dels valors d'abundància relativa de les isoformes de l'LPL. Representació en box-plot de la mediana i els percentils de distribució de les isoformes, per a cada teixit estudiat (cor, TAB, TAM i múscul), segons les dades de la **Taula 6**.

6.5.3. Obtenció de les poblacions (o clústers)

A partir de la descripció feta fins el moment de les isoformes, vam estudiar-les mitjançant el seu valor de pl i abundància relativa per descriure poblacions (o clústers), a través d'una anàlisi exploratòria dels clústers d'aquestes isoformes de rata adulta, cria i en diferents situacions fisiològiques.

Per poder estudiar aquest aspecte, vam fer servir diferents estadístics que ens orientarien cap a la decisió del nombre de poblacions o clústers. Abans d'aplicar qualsevol criteri, és necessari que les variables no estiguin relacionades. La Taula 7 demostra que no hi ha correlació entre les variables utilitzades.

Coeficients de correlació Spearman, N = 127 Prob > r under H0: Rho=0			
Variables	pl	Abundància	TA
pl	1.000	0.24489	0.04007
		0.0055	0.6547
Abundància		1.000	-0.02134
			0.8118
TA			1.000

Taula 7. Correlació entre els paràmetres variables que defineixen els clústers. Anàlisi de la correlació del pl, l'abundància relativa i el tipus de teixit (TA), ja sigui teixit adipós (TAB i TAM) o teixit muscular (cor i múscul) mitjançant el coeficient d'Spearman (n=127).

Els estadístics utilitzats per definir els criteris del nombre de clústers possibles per aquest estudi van ser: CCC, Pseudo F i Pseudo T². La representació de cada criteri és a la Figura 80.

Per a qualsevol criteri de la Figura 80, el nombre de clústers que es proposa és cada vegada que apareix un canvi de vessant. A més, cada estadístic té els seus criteris:

- Pel que fa a l'estadístic CCC busquem un pic per sobre del valor 0. Amb valors de CCC superiors a 2 l'ajust és bo. En el nostre cas estem entre 0 i 2 el que suggereix possibles clústers. Triem el punt corresponent a 3 clústers
- Pel que fa a Pseudo F busquem un pic i el trobem en el punt corresponent a 3 clústers.
- Pel que fa a Pseudo T² quan es troba un pic s'afegeix 1: torna a coincidir en 3 clústers

Com que tots tres criteris obtenen un resultat de **3 possibles clústers**, acceptem aquest valor. Aquest resultat també és coherent amb el resultat del dendrograma obtingut a la Figura 81. En la jerarquització de les isoformes, tenim que R²=0,514 ja assenyalava 3 clústers. Els clústers es poden definir quan la diferència entre punts de la jerarquització amb valors d'R² són força diferents. Per exemple, la diferència entre R²=0,568 amb 4 clústers (no representat a la Figura 81) i R²=0,514 amb 3 clústers és només de 0,054 però la diferència entre R²=0,514 amb 3 clústers i R²=0,259 amb 2 clústers és de 0,255. Així ens quedem amb 3 clústers.

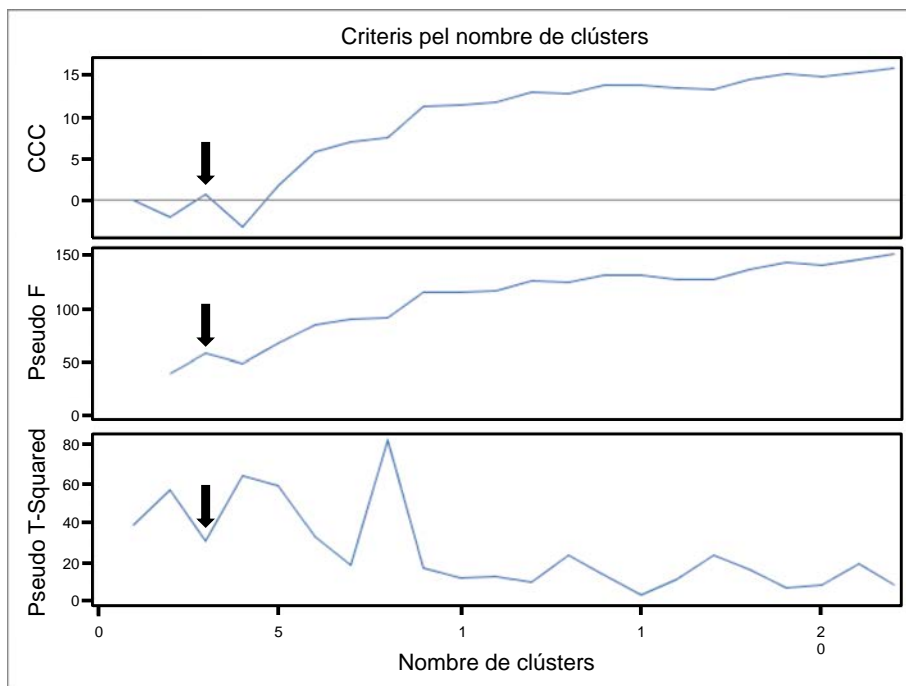


Figura 80. Criteris d'obtenció dels clústers. Els estadístics CCC, Pseudo F i Pseudo T-Squared determinen quants clústers generar a partir de les dades de pl i abundància relativa de les isoformes de totes les dades disponibles (rata adulta, cria i situacions fisiològiques) (n=127). La fletxa negra indica el nombre de clústers que recomana cada estadístic.

Dendrograma

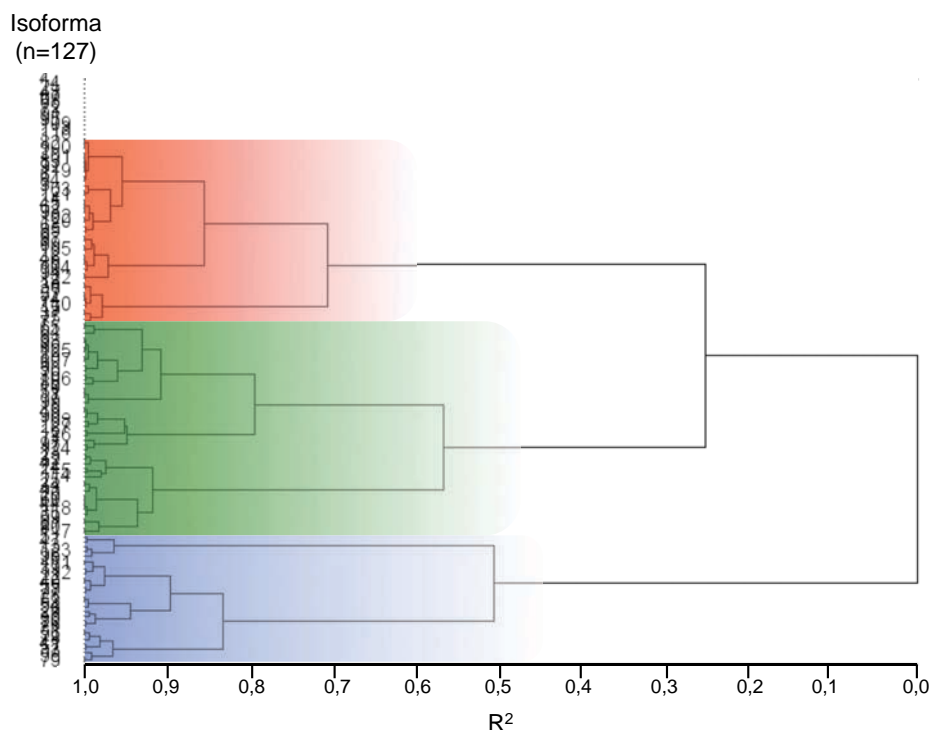


Figura 81. Dendrograma de la classificació de les isoformes de pl. Jerarquitització de les isoformes segons els criteris de creació de clústers (Figura 91), segons la seva proximitat (mètode del veí més llunyà - R^2). Al gràfic queda representat el resultat dels clústers per tres rectangles (vermell, verd i blau) (n=127).

La tècnica de clústers és només exploratòria per veure possibles agrupacions. Per aquest motiu, és recomanable excloure valors extrems ja que els clústers poden resultar molt distorsionats, especialment amb el mètode del veí més llunyà. Per això no apareixen tots els valors a la Figura 82, sinó que s'han exclòs el 10% isoformes. Els 114 valors restants encara són suficients per al disseny dels clústers.

Una vegada definit que les isoformes de pI de l'LPL poden ser categoritzades en tres clústers (Figura 81), vam representar-les segons les seves dues variables (pI i abundància). La variable "tipus de teixit" (TA) únicament la vam fer servir per poder treballar amb aquesta metodologia, ja que són necessàries 3 variables per al disseny dels clústers.

Com a resultat d'aquesta anàlisi, cada clúster el vam anomenar segons l'interval de pH en què es distribueixen les seves isoformes: **àcid**, **neutre** i **bàsic** (Figura 82).

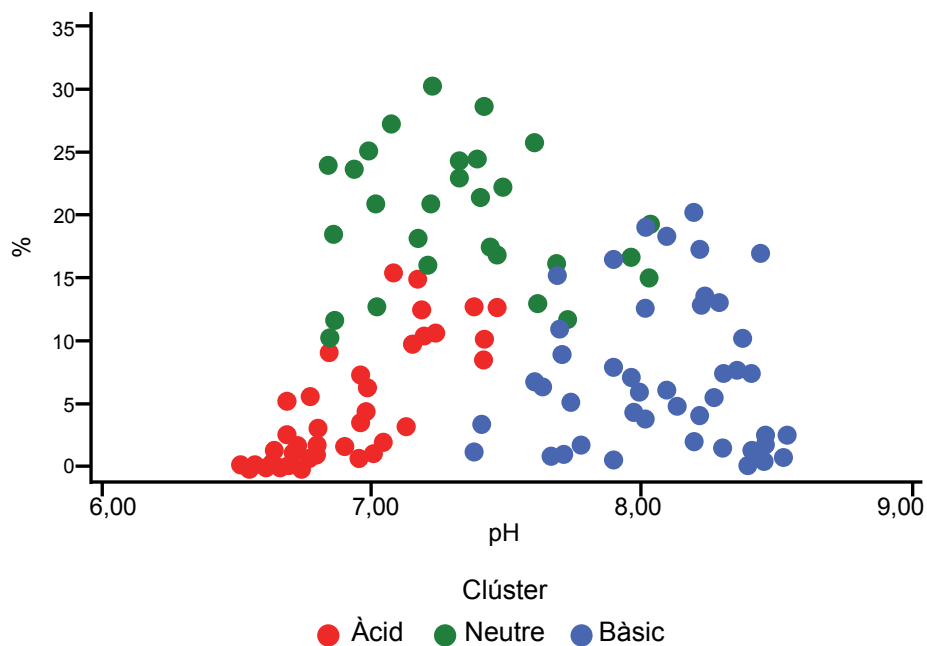


Figura 82. Classificació de les isoformes de l'LPL segons els clústers de la Figura 81.

Les variables del pI i de l'abundància relativa de cada isoforma determinen la formació de cada clúster. Valors obtinguts en les diferents purificacions d'LPL de teixits de rata adulta, cria i situacions fisiològiques (n=114). A més, s'han representat segons la seva pertinença a cada clúster: àcid (vermell; n=40), neutre (verd; n=28) o bàsic (blau; n=46).

Tot i que existeix solapament de la distribució dels pI dels clústers fins i tot dels extrems, és molt clara la distribució de cada clúster (Figura 83). A més, l'abundància relativa també és un factor que diferencia els clústers (Figura 84).

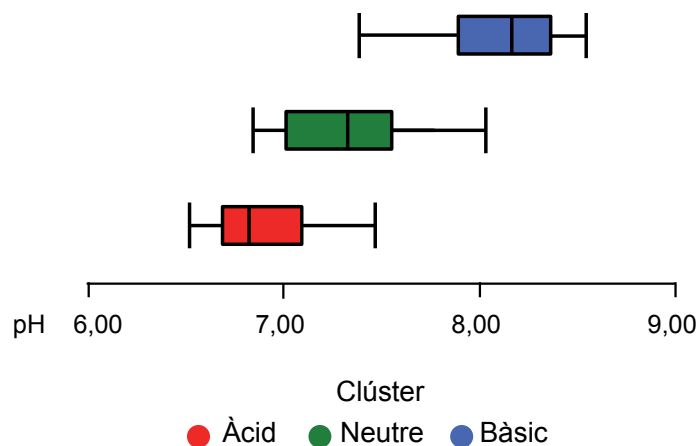


Figura 83. Distribució dels pI de les isoformes de l'LPL segons els clústers de la Figura 81. Representació en box-plot de la mediana i els percentils de distribució dels valors dels pI del conjunt d'isoformes (n=114) inclòs en cada clúster (àcid n=40, neutre n=28 i bàsic n=46).

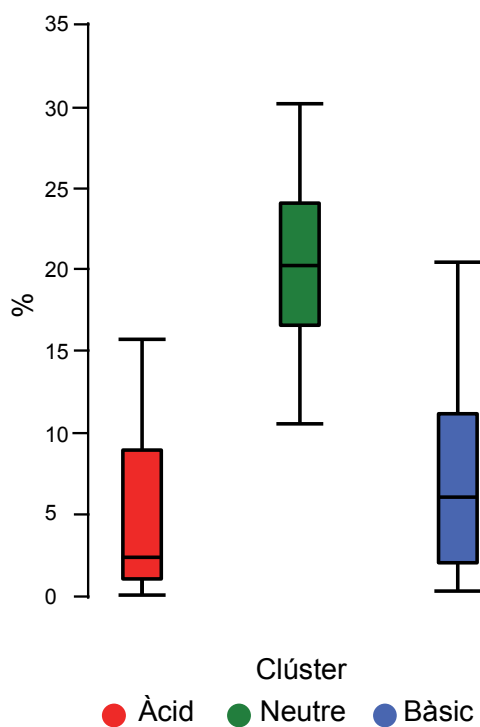


Figura 84. Distribució dels valors d'abundància relativa de les isoformes de l'LPL segons els clústers de la Figura 81. Representació en box-plot de la mediana i els percentils de distribució dels valors d'abundància relativa del conjunt d'isoformes (n=114) inclòs en cada clúster (àcid n=40, neutre n=28 i bàsic n=46).

En resum, existeixen tres clúster de classificació de les isoformes de l'LPL dels diferents teixits i condicions estudiats:

- Clúster "àcid": amb isoformes de pl entre 6,51 i 7,46 i amb una abundància relativa inferior al 16%.
- Clúster "neutre": les seves isoformes inclouen els pl des de 6,83 fins a 8,02 i tenen una elevada abundància relativa (superior al 10%).
- Clúster "bàsic": inclou isoformes amb pl en l'interval de pH 7,37 – 8,53 i amb una abundància inferior al 20%. Tot i ser una abundància màxima força elevada, la seva mediana és del 6%.

Aquests resultats són una aproximació de la classificació de les isoformes. Aquests clústers ens permeten fer un estudi prospectiu en la variació de les isoformes de rata en diferents condicions (teixit, edat o condició fisiològica).

Clústers d'isoformes en diferents teixits de rata

El primer cas d'estudi, és en la distribució de les isoformes segons els teixits estudiats en rata.

A la Taula 8 es descriu, per a cada teixit, el número d'isoformes que es corresponen a cada clúster. A més, també hi ha el percentatge que representa cada clúster respecte el total d'isoformes del teixit. Els percentatges també s'han representat de forma gràfica a la Figura 85.

Teixit	Clúster					
	Àcid		Neutre		Bàsic	
	N	%	N	%	N	%
Cor	8	19.5	18	43.9	15	36.5
TAB	23	54.7	2	4.7	17	40.4
TAM	8	36.3	3	13.6	11	50.0
Múscul	1	11.1	5	55.5	3	33.3
Total	40	35.0	28	24.5	46	40.3

Taula 8. Caracterització i distribució de les isoformes de l'LPL entre diferents teixits segons els clústers de la Figura 81. Dades del nombre d'isoformes (i percentatge) incloses a cada clúster per als teixits estudiats en rata (cor, TAB, TAM i múscul) (n=114).

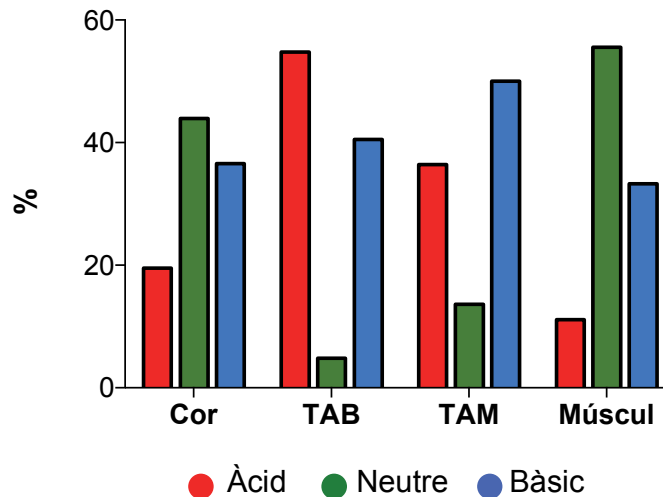


Figura 85. Percentatge d'isoformes de l'LPL en cada clúster a partir de la creació dels 3 clústers (Figura 81). Representació del percentatge d'isoformes en cada clúster (àcid, neutre o bàsic) per a cadascun dels teixits estudiats en rata (cor, TAB, TAM i múscul). Valors extrets de la **Taula 8**. (n=114).

La distribució de les isoformes entre els diferents clústers, per a cada teixit, descriu clarament dues tendències. Una d'aquestes tendències és la que engloba els teixits musculars (múscul i cor), els quals presenten una elevada proporció d'isoformes del clúster neutre, en menor mesura, isoformes bàsiques i poques àcides. La segona tendència és la dels teixits adiposos (blanc i marró), que presenten molt poques isoformes del clúster neutre però elevats percentatges dels clústers més extrems.

Pel que fa a les **abundàncies d'aquestes isoformes** (quantitat de proteïna), es representen a la Figura 86 tots quatre teixits presenten la distribució que descriu els clústers: isoformes àcides i bàsiques amb baixa abundància relativa, mentre que les isoformes neutre tenen les majors abundàncies. Sorprenentment, la dispersió o variabilitat d'abundàncies és major en els valors baixos. Al ser un estudi prospectiu i no disposem de suficients replicats, no podem assegurar que aquesta diferència entre les dispersions sigui deguda a la metodologia (quantificació de la proteïna).

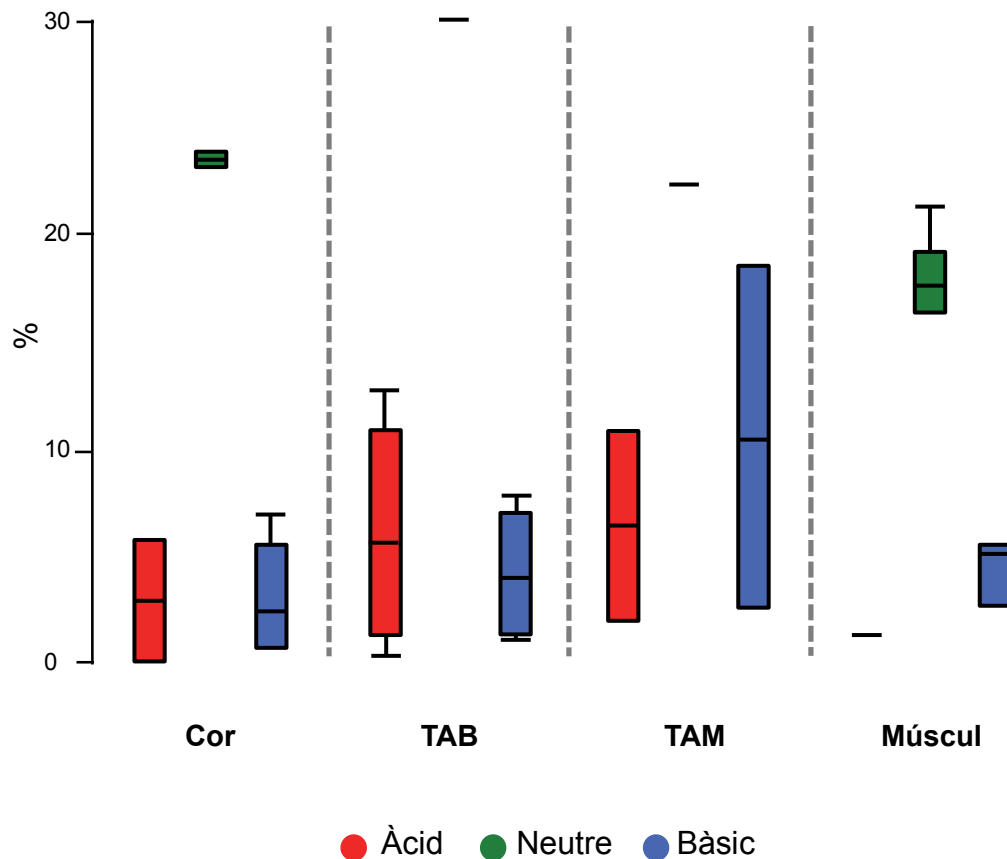


Figura 86. Distribució dels valors d'abundància relativa de les isoformes de l'LPL. Per a cada teixit, representació en box-plot de la mediana i els percentils de distribució d'abundància relativa de les isoformes dels tres clústers àcid (vermell), neutre (verd) o bàsic (blau) de les isoformes de pl de rata adulta (n=32).

Clústers d'isoformes en cria de rata

Al capítol precedent hem descrit els patrons d'isoformes de l'LPL en teixits de cria de rata (Figura 21 i Figura 22) i els hem comparat amb els mateixos teixits d'animals adults (Figura 27 i Figura 29). El patró d'isoformes de cor o de TAM tenen comportaments lleument diferents durant el desenvolupament de l'animal: tot i mantenir els mateixos pl, les abundàncies relatives presentaven petites diferències.

Ara ens plantegem si aquestes diferències en l'abundància relativa, ja descrites, poden també reflectir-se en els clústers d'isoformes de cria de rata, comparats amb els de rata adulta.

La representació de l'abundància relativa de les isoformes en els clústers, en el dos moments del desenvolupament de les rates (Figura 87), permet veure una elevada similitud entre tots dos moments, sobretot pel que fa a les medianes. Tanmateix, destaca el solapament de les abundàncies de les isoformes neutres de cria amb les bàsiques d'adult.

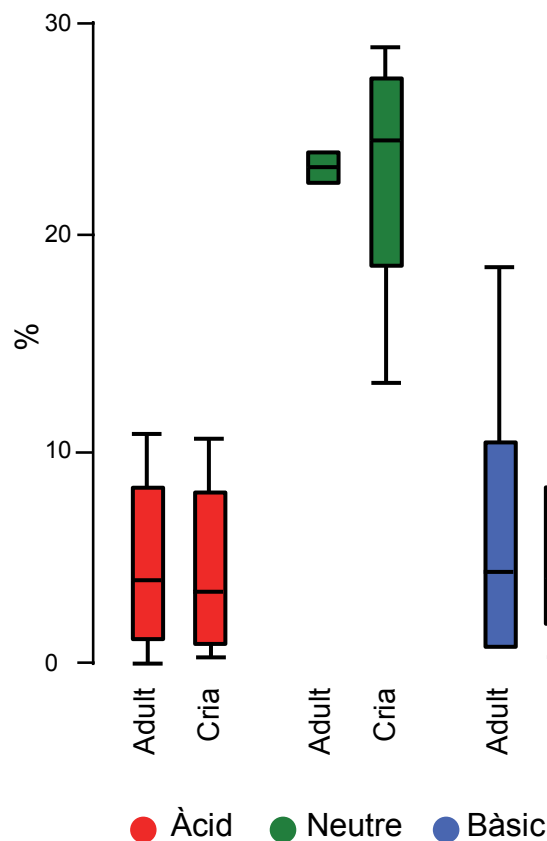


Figura 87. Comparació dels valors d'abundància relativa de les isoformes de l'LPL. Per a cada moment del desenvolupament (rata adulta o cria), representació en box-plot de la mediana i els percentils de distribució d'abundància relativa de les isoformes dels tres clústers àcid (vermell), neutre (verd) o bàsic (blau) de les isoformes de pl de cor i TAM (n=33).

Clústers d'isoformes en diferents situacions fisiològiques

Finalment, ens vam plantejar comparar la distribució de les isoformes de l'LPL en els tres clústers en les diferents condicions fisiològiques: fred, dejuni i realimentació (Figura 49).

Fins al moment, hem observat que les diferents situacions fisiològiques han causat gran varietat de respostes en els diferents teixits: des de variació de l'activitat LPL a variació del patró d'isoformes o la seva abundància relativa. Però en aquesta anàlisi exploratòria només vam voler estudiar l'efecte de la condició fisiològica sobre els clústers i, per tant, no vam incloure la variable teixit en la comparació (Figura 88).

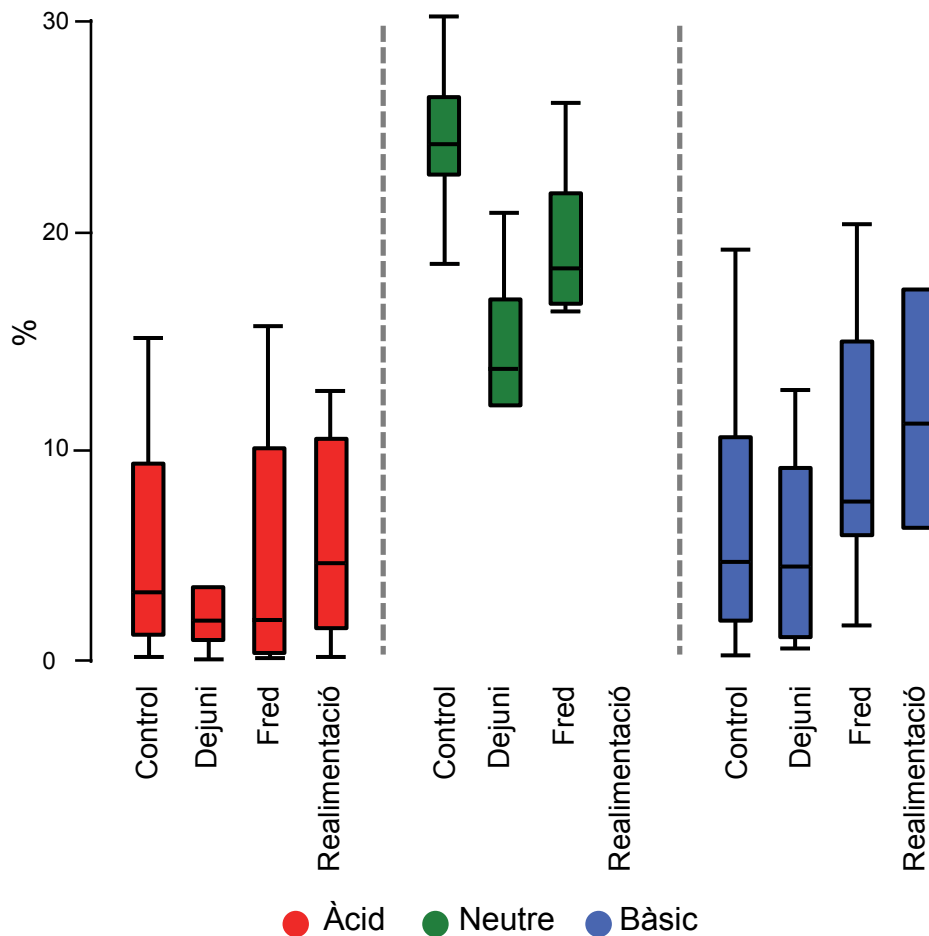


Figura 88. Comparació dels valors d'abundància relativa de les isoformes de l'LPL.

Per a cada situació fisiològica (control, fred, dejuni i realimentació), representació en box-plot de la mediana i els percentils de distribució d'abundància relativa de les isoformes dels tres clústers àcid (vermell), neutre (verd) o bàsic (blau) de les isoformes de pI de cor, TAB i TAM de rata adulta (n=105).

En la descripció de l'abundància relativa en els diferents clústers destaca:

- En el clúster **àcid**: el dejuni provoca una reducció molt marcada en l'abundància d'aquestes isoformes. En les altres circumstàncies (fred o realimentació), aquest fet no és tan evident. De fet, les isoformes del clúster àcid dels animals realimentats presenten una tendència a recuperar l'abundància dels animals control.
- En el clúster **neutre**: primerament sorprèn l'absència d'isoformes dels teixits realimentats (únicament vam fer el TAB). Això vol dir que en el TAB realimentat no hi ha isoformes que tinguin les dues característiques d'aquest clúster → pI entre 6,83 i 8,02 i abundància relativa superior al 10,47%. A més, per a les altres condicions fisiològiques també es detecta una tendència a reduir l'abundància relativa d'aquestes isoformes.
- En el clúster **bàsic**: es compensa la reducció de l'abundància en el clúster neutre de la condició de fred. També destaca l'alta abundància de la realimentació. Curiosament, el dejuni, el qual havia presentat reduïdes abundàncies en els clústers àcid i neutre respecte del control, presenta una mediana molt propera al control.

6.5.4. Discussió: poblacions d'isoformes de pl

L'estudi de les poblacions (clústers) de les isoformes de pl de l'LPL és una eina molt innovadora i sense precedents bibliogràfics, que permet avaluar les característiques del conjunt d'isoformes des d'una perspectiva de conjunt que amb els paràmetres estudiats (pl i abundància relativa) no seria possible.

Si primer analitzem els resultats obtinguts en la descripció de les variables de les isoformes, hem de destacar el fet que l'interval de pl es manté molt constant en els diferents teixits, ja que els valors obtinguts en l'estudi de rata adulta és pràcticament el mateix que en les diferents situacions fisiològiques (Figura 78). Per altra banda, l'abundància relativa (Figura 79) sí que presenta major dispersió, segurament causat per la inclusió a l'estudi les poblacions d'isoformes en diferents situacions fisiològiques. L'efecte es veu clarament en el múscul, l'únic teixit del qual no se n'han estudiat les variacions del patró en diferents condicions fisiològiques. És aquest teixit el que manté menor dispersió de l'abundància relativa.

En els resultats que es desprenen a partir de la descripció dels tres clúster, és molt interessant la Figura 85: clarament els teixit musculars (cor i múscul) presenten un major nombre d'isoformes del clúster neutre en comparació als teixits adiposos. Això vol dir que cor i múscul presenten isoformes d'interval fisiològic amb elevada abundància relativa.

Aquesta observació es pot lligar amb els resultats de diversos estudis. En el treball de Levak-Frank (1999) descriu com l'LPL de múscul o cor és suficient per mantenir la viabilitat de ratolins. Els animals sense expressar LPL en TAB presentaven una morfologia i massa dels teixits adiposos correcta, respecte els animals control (Weinstock et al., 1997). En aquests treballs no arriben a poder justificar quines són les característiques de l'LPL present en teixit muscular (múscul o cor) que permeten controlar el nivell de TAG circulants, a diferència de l'LPL expressada en TAB. A més, també és molt important el balanç entre l'LPL de múscul i TAB per definir l'estat fisiològic dels animals, ja sigui perquè estan en situació d'emmagatzematge de reserves (més LPL en TAB que en múscul) o en situació de mancança d'aliments (poca activitat LPL en TAB).

Per altra banda, que les condicions fisiològiques causen variacions en la distribució de l'abundància de les isoformes també es confirma a través dels clústers (Figura 88). Una clara tendència és la reducció d'isoformes del clúster neutre en favor dels altres clústers en qualsevol situació fisiològica (fred, dejuni o realimentació).

Tot i no haver pogut demostrar que les isoformes més abundants en el TAB en dejuni –de pl més bàsic- siguin inactives, és evident que l'estrès causat pel canvi en les condicions fisiològiques de l'animal desplaça part de les isoformes de l'interval de confort: el clúster neutre, de pH fisiològic.

6.6. Discussió: diferents situacions fisiològiques

L'efecte dels diferents tractament en rata (fred, dejuni i realimentació) van produir la resposta en l'**activitat LPL** dels teixits estudiats descrita ja en la bibliografia.

El cas del **fred**, segons C. Carneheim (1984), provoca que l'activitat LPL del TAM augmenti més de set vegades el valor del control. El valor màxim d'activitat està descrit a partir de les 12 hores des de l'inici del tractament. Un altre treball (Bertin et al., 1985) també descriu la resposta d'aclimatació al fred a llarg termini (6 setmanes). El resultat mostra un augment d'activitat LPL en TAM del 100% respecte el control. En aquest mateix treball es descriu que l'activitat LPL en TAB en adaptació al fred augmenta un 100%. Els mateixos resultats però de menor magnitud que R. Bertin (1985) van ser obtinguts per Y. Deshaies (1986) en una aclimatació al fred de 45 dies: l'augment en TAM és del 46%, en TAB també es descriu un augment, del 41% , sempre respecte els control.

Segons aquestes referències, el resultat obtingut en TAM del nostre experiment és força coherent, sobretot amb els de C. Carneheim (1984). Part d'aquest ràpid augment d'activitat en TAM és degut a modificacions posttraduccionals, sobretot a les primeres hores (Giralt et al., 1990): en un treball desenvolupat en femelles de rata, durant les primeres 6 hores d'adaptació a 4°C, l'augment d'ARNm d'LPL és del 250%, tot i que l'augment de l'activitat LPL és del 640%. Per altra banda, els resultats bibliogràfics d'activitat LPL en TAB (Bertin et al., 1985; Deshaies et al., 1986) són totalment oposat al valor obtingut en el nostre experiment, en què vam detectar una reducció, encara que no significativa, de l'activitat LPL. Possiblement aquesta diferència recaigui en la durada de l'exposició al fred. En els nostres resultats (adaptació a curt termini) la resposta del TAB és reduir el consum de TAG circulants per permetre'n l'adquisició per part de TAM i cor, mentre que en tots dos treballs citats, (adaptació a llarg termini) el TAB ja ha pogut desenvolupar una resposta adaptativa al fred i mantenir valors elevats d'activitat LPL.

En cor està descrit que el fred n'afecta l'activitat LPL (Cheng and Hauton, 2008). De la mateixa manera que hem obtingut en els nostres resultats, Y. Cheng (2008) descriu un augment significatiu de l'activitat LPL del 90%. Tanmateix, en aquest treball estudien l'adaptació al fred en un procés de 4 setmanes de durada des de 22°C fins a 4°C. En el nostre cas, l'efecte del fred va ser sense adaptació i de menys de 24h.

Així, pot ser que sota l'efecte de fred, l'activitat LPL se centra en mantenir l'entrada de lípids com a substrat energètic en teixits d'elevat consum: cor i TAM. Aquesta modulació és a canvi d'una reducció de l'activitat LPL en el TAB, el qual, temporalment, esdevé un teixit exportador de NEFA. En el moment en què el fred esdevé crònic, l'activitat en TAB es recupera.

La resposta de l'LPL al **dejuni** també ha estat àmpliament descrita. Tot i que sobretot s'ha estudiat en rata, també en altres espècies com humans (Ruge et al., 2001), ratolí (Ruge et al., 2004) o conill d'Índies (Semb and Olivecrona, 1986) s'han descrit variacions, tant d'activitat LPL com de síntesi de l'LPL.

En TAB està molt ben descrita la variació d'activitat LPL causada pel dejuni, ja a curt termini (<12h) es descriu una forta caiguda de l'activitat (Bergo et al., 1996a, b; Doolittle et al., 1990; Wu et al., 2003). Aquests resultats són coincidents amb els obtinguts en el nostre disseny experimental, en què l'activitat LPL en TAB va resultar molt reduïda. Aquesta valor tan baix d'activitat LPL és constant a

mesura que el dejuni es manté (Bergo et al., 1997; Bergo et al., 2002; Llado et al., 1999; Quig et al., 1983). Tanmateix, el comportament de la síntesi d'ARNm d'LPL és diferent entre els dejunis de curt i llarg termini: inicialment, augmenta la concentració d'ARNm i, a mesura que augmenta el temps de dejuni, aquest ARNm es redueix.

Pel que fa al TAM, en el treball d'l. Lladó (1999) descriuen un augment de l'activitat LPL, el qual no és acompanyat per un augment de la quantitat de proteïna. Per aquest motiu, dissenyen la hipòtesi que l'activitat LPL en TAM és regulada posttraduccionalment. Curiosament, els nostres resultats no han descrit cap diferència en l'activitat LPL en el TAM dels animals en dejuni, ni tan sols una tendència no significativa. En el cas d'l. Lladó (1999), van mantenir un dejuni de 24 hores, mentre que el nostre va ser de 18h. Aquesta diferència de temps de tractament difícilment pot justificar la diferència dels valors d'activitat LPL.

El dejuni del cor ha estat també estudiat, sovint juntament amb el TAB. De la mateixa tendència que la variació descrita en els nostres resultats, D. W. Quig (1983) descriu un augment de l'activitat en cor en dejuni; i M. H. Doolittle (1990) obté un augment del 130% de l'activitat LPL en el cor dels animals en dejuni. Per altra banda, el treball de M. Bergö (1996b) després d'un dejuni de 15 hores no detecta cap variació en l'activitat LPL del cor, però sí que descriu una disminució en el TAB.

La **realimentació** és un procés adaptatiu menys estudiat pel que fa a la bibliografia, en comparació al fred o al dejuni. Sobretot s'ha estudiat el seu efecte en TAB. En el treball ja citat de D. W. Quig (1983) descriu que els animals alimentats *ad libitum* després d'una restricció severa de menjar presenten un increment de 3 vegades l'activitat LPL de TAB després de 9-12 dies (efecte rebot). Aquesta resposta al dejuni és justificada per la necessitat del teixit per regenerar els TAG i per la seva capacitat d'actuar com a magatzem. Per altra banda, en el cor descriu que augmenta l'activitat LPL fins al valor d'inici del dejuni.

En un altre treball (Bergo et al., 1996a) es descriu la resposta a la realimentació en el TAB pel que fa a ARNm d'LPL, massa i activitat de l'enzim posterior a un dejuni curt (24h). La tendència en aquests tres paràmetres és recuperar l'estat inicial. Per tant, es redueix l'ARNm i s'augmenta la massa d'LPL i la seva activitat. Aquests valors es normalitzen a partir de les 3h des de l'inici de la realimentació. A diferència de D. Q. Quig, M. Bergö no descriu cap repic d'activitat LPL en les 8 hores següents a la reintroducció de menjar.

Els nostres resultats són força coherents amb el treball de Bergö, ja que els valors d'activitat LPL en TAB de rata es va normalitzar respecte el control en només 2 hores. No és gens sorprenent la similitud dels resultats, ja que tots dos dissenys experimentals són molt similars.

La resposta de l'activitat LPL del cor al fred i al dejuni ha estat un resultat molt similar, pràcticament idèntic. A més, els animals mantinguts en fred o dejunats també van tenir un increment negatiu de pes corporal. Aquests resultats ens van fer plantejar que possiblement els animals mantinguts a 4°C, a més de partir els efectes del fred, també van patir l'efecte del dejuni. Lamentablement, no

tenim les dades de variació de pes del pinso, per poder dir si els animals van menjar o no.

Però aquesta hipòtesi es va descartar en el moment en què, a través de la bibliografia vam veure que és habitual que els animals mantinguts en fred, malgrat haver menjat més pinso, hagin reduït el pes corporal (Deshaies et al., 1986). Per tant, qualsevol efecte descrit en els animals exposats al fred no es podria atribuir a l'aparent dejuni sofert.

A més, les respostes del TAB i TAM al fred i al dejuni van ser prou diferents per no poder-les confondre les dues situacions fisiològiques.

En l'estudi dels **patrons de les isoformes de pl de l'LPL**, la discussió dels resultats s'ha organitzat al voltant dels teixits i no dels tractaments. D'aquesta manera és més fàcilment comparable l'efecte de l'adaptació de les isoformes d'un teixit.

L'estudi dels patrons en el **cor** de rata ha obtingut uns resultats sorprenents, ja que en dues situacions fisiològiques (fred i dejuni) en què l'activitat LPL es va veure augmentada com a resposta, el comportament del patró ha estat diferent (Figura 70 i Figura 75). Aquest fet és sorprenent perquè indica que la resposta a la variació de les condicions ambientals tant pot ser no només a nivell d'activitat sinó també a nivell de regulació posttraduccional. Amb els coneixements actuals de regulació de l'LPL, no podem plantejar cap hipòtesi que justifiqui les variacions dels patrons entre les diferents situacions fisiològiques. De tota manera, part de la resposta del cor davant del dejuni es pot relacionar amb l'estudi de T. Ruge (2000): descriuen que el cor genera més llocs d'ancoratge a l'endoteli per l'LPL. Una possibilitat és que aquest nou ancoratge sigui el causant de l'aparició d'un nou conjunt d'isoformes de pl de l'LPL (Figura 70).

En el cas del **TAB**, el patró manté els mateixos pl en totes quatre situacions fisiològiques (Figura 70). Tant el fred com el dejuni han causat una pèrdua d'activitat LPL en els animals i, curiosament, en tots dos casos, l'abundància relativa s'ha desplaçat cap a les isoformes més bàsiques (Figura 76). I, novament, l'augment d'activitat causat per la realimentació, redueix l'abundància relativa d'isoformes de pl més bàsics i reapareixen les més àcides. Tot i la hipòtesi inicial (les isoformes de pl més bàsic són un reservori inactiu de l'activitat LPL), hem pogut confirmar que aquestes isoformes més bàsiques són igualment actives (Figura 77) i que no representen un reservori d'isoformes inactivades posttraduccionalment, a l'espera de ser mobilitzades.

En el **TAM**, l'únic patró que s'ha comparat és el dels animals exposats al fred (Figura 72). En aquest cas, l'augment de l'activitat LPL del teixit es va traduir en una variació dels pl de les isoformes de l'LPL.

Des d'una altra perspectiva, hem dissenyat un mètode d'**estudi de les poblacions d'isoformes de l'LPL** per determinar les diferències entre els patrons observats (nombre d'isoformes, pl i abundància). Mitjançant la informació de pl i abundància relativa s'ha caracteritzat en tres poblacions (clústers) totes les isoformes de l'LPL. Els resultats de l'anàlisi dels clústers també indiquen variacions en l'abundància

relativa de les isoformes de cada clúster, segons quina sigui la situació fisiològica en què es trobi l'animal (Figura 88).

Aquest sistema d'anàlisi també ha estat aplicat en altres circumstàncies i confirma que durant el desenvolupament, les isoformes del cor i TAM de rata mantenen un patró molt constant.

És evident que la regulació de l'LPL en els diferents teixits i situacions fisiològiques és un procés molt complex: no només l'exposició a una nova situació provoca diferents variacions d'activitat LPL en els teixits, sinó que, malgrat tenir la mateixa resposta, la variació del patró d'isoformes de diferents teixits pot ser completament diferent.

En un principi semblava que una pèrdua d'activitat LPL del teixit es podia traduir en un augment de les isoformes més bàsiques. Aquesta hipòtesi s'extrau dels resultats del TAB. Però aquestes isoformes més bàsiques segueixen sent actives (Figura 77). Possiblement l'activitat específica de l'LPL (NEFA produïts per unitat de temps i per gram de proteïna) podria ser menor a les isoformes de pl més bàsic. Però aquesta hipòtesi es va desmuntar en l'anàlisi de la distribució de l'LPL en el cor: el fred també basifica la distribució les isoformes, però origina un augment de l'activitat LPL del teixit.

Un cas clar de la complexitat en la regulació de l'activitat LPL és el cor, el qual augmenta la seva activitat tant en l'exposició al fred com a resposta al dejuni. Però segons quin sigui l'estímul, el patró manté els pl de les isoformes del control (fred) o no (dejuni).

Una altra evidència per demostrar la complexitat de la regulació de l'activitat LPL es detecta en la resposta del fred en cor i TAM. En tots dos teixits, la nova situació fisiològica causa un augment de l'activitat LPL. Però mentre que en el cor manté els pl de les isoformes, en el TAM perden totalment la distribució respecte del control.

Aquestes variacions dels patrons d'isoformes de l'LPL en diferents situacions fisiològiques plantegen la importància de la regulació a nivell posttraduccional d'aquesta proteïna. Aquesta hipòtesi en un elevat nombre de publicacions ha estat suggerida com a la principal forma de regulació de l'LPL (Kersten, 2014). A més, cada vegada es descriuen més proteïnes implicades en la regulació de l'activitat LPL, p.e. GPIHBP1 (Dallinga-Thie et al., 2010; Kroupa et al., 2012; Olivecrona, 2016).

Aquestes proteïnes podrien desenvolupar un paper important en la selecció de les isoformes segons cada situació fisiològica. Una possibilitat és que la inactivació de l'LPL per monomerització via ANGPTL4 no afectés de la mateixa manera als diferents conjunts d'isoformes. Així, algunes isoformes podrien resistir major concentracions d'aquesta proteïna. Actualment es desconeix el mecanisme d'interacció entre l'ANGPTL4 i el dímer d'LPL.

La presència de GPIHBP1 és necessària pel correcte funcionament de l'LPL. Tot i no haver presentat afinitat diferencial per a l'heparina, podria ser que l'afinitat de les isoformes amb la GPIHBP1 fos variable, en funció del pl. La GPIHBP1 és la

plataforma necessària per l'LPL a la llum endotelial i s'ha descrit que pot viatjar bidireccionalment a través de l'endoteli (Davies et al., 2012). Per tant, s'obra un camp nou molt interessant de regulació de les isoformes de pl de l'LPL a través d'aquesta proteïna.

Cal anar en compte a l'hora d'analitzar les conseqüències d'aquesta descripció i mantenir la perspectiva. Per una banda, aquests resultats són prospectius: calen més rèpliques dels assajos per obtenir major fortalesa estadística. A més, per problemes metodològics, alguns patrons no els hem pogut descriure i els seus equivalents en diferents situacions fisiològiques els hem hagut de comparar amb els controls obtinguts en l'apartat primer.

Per altra banda, hem de tenir present que a l'estudi dels valors de pl obtinguts en els diferents assajos, prèviament a la comparació dels pl, ha resultat que la normalitat dels residus del TAM no segueix una distribució normal. Haver acceptat normalitat de residus, ens pot haver generat una mala creació dels intervals de confiança pel TAM.

7. Conclusions : funció

- Hem determinat que en TAB de macaco totes les isoformes de pl són actives. Per tant, sembla que cap de les isoformes de pl representa un reservori d'LPL inactiva, sinó que són enzimàticament actives totes. Aquest fet es comprova també en el TAB de rata en situacions fisiològiques. Tanmateix, no podem diferenciar cinètiques enzimàtiques entre les diferents isoformes.

- Hem demostrat en el macaco que no hi ha diferències entre les isoformes en la seva afinitat per l'heparina.

Per tant, les possibles modificacions posttraduccional que generen les isoformes de pl de l'LPL no suposen variacions en l'afinitat per l'heparina ni determinen que l'enzim sigui o no actiu.

- Hem demostrat, en rata, que les variacions fisiològiques de l'activitat LPL modifiquen el patró d'isoformes. Un clar exemple és la resposta del TAB epididimal al dejuni i posterior realimentació. La resposta al dejuni és una reducció de l'activitat i una reducció de les isoformes més àcides. La realimentació ràpidament recupera l'activitat LPL i la distribució del patró d'isoformes típic del teixit control o situació d'alimentació.

- El fred suposa un comportament diferent en funció del teixit estudiat. Per exemple fa variar el pl de les isoformes del TAM, mentre que en el TAB i el cor suposa únicament un augment de l'abundància de les isoformes més bàsiques.

- Hem comprovat en rata, que el sistema d'anàlisi dels patrons tissulars i la caracterització de les isoformes de pl de l'LPL en poblacions (o clústers) és una eina que permet discriminar diferents poblacions segons les característiques de les isoformes (pl, abundància relativa). Aquest model d'estudi d'isoformes i patrons de distribució es pot aplicar a altres proteïnes.

- Hem estudiat també la variació de les abundàncies relatives de les tres poblacions caracteritzades (clústers àcid, neutre i bàsic) entre diferents situacions fisiològiques. En general, respecte el control, hem descrit una reducció de l'abundància de les isoformes neutres en les situacions d'estrès estudiades (fred, dejuni i realimentació), així com una reducció de l'abundància de les isoformes en tots els clústers (àcid, neutre i bàsic) en situació de dejuni.

- A través d'aquesta sistemàtica, hem determinat que en teixits musculars (cor i múscul esquelètic), són més abundants en la població (o clúster) d'isoformes neutres, mentre que en els teixits adiposos (TAB i TAM) la proporció d'isoformes neutres és molt reduïda. Aquesta diferència es pot associar a les funcions generals que desenvolupa cada tipus de teixit.

Origen de les isoformes de pI de l'LPL

1. Antecedents

Els resultats obtinguts en els anteriors apartats (en referència a la distribució de les isoformes i a la seva funció) ens han demostrat que les isoformes de pI de l'LPL segueixen diferents patrons de distribució en funció del teixit. A més, aquesta distribució de cada teixit pot variar segon la situació fisiològica en la qual es trobi l'animal. Resultats similars han estat descrits en altres proteïnes. Un exemple és el treball de J. Bouley sobre el múscul esquelètic boví, en el qual descriuen el patró de diverses proteïnes d'aquest teixit i proposen l'ús dels patrons d'isoformes d'aquestes proteïnes per determinar l'estat fisiològic de l'animal i la qualitat de la carn (Bouley et al., 2004). Un altre cas se centra en la superòxid coure/zinc dismutasa humana, els mutants de la qual presenten un conjunt d'isoformes més bàsiques en comparació als pacients sans. Aquestes variants són menys solubles i generen agregats en malalts afectats per esclerosi lateral amiotròfica (Roudeau et al., 2015). També, s'ha estudiat la correlació dels intervals de pH de distribució de les isoformes de la glutatió transferasa en múscols amb la contaminació de les aigües on habiten (Azevedo et al., 2015) o la correlació entre transició d'isoformes de múltiples proteïnes i el desenvolupament de llavors (Finnie, 2005). En tots els estudis, l'origen d'aquestes isoformes és desconegut o poc estudiat: principalment s'associen a PTM (majoritàriament fosforilacions i glicosilacions), trencament proteic o maduració alternativa.

Si ens centrem en l'origen de les isoformes de l'LPL, la seqüenciació de la lipasa a partir de l'ADNc s'ha descrit en diverses espècies. En el treball d'A. Raisonier (1995) o de R. S. Holmes (2011) es comparen les seqüències de l'LPL de diverses espècies: humana, bovina, de rata o de macaco, entre d'altres. Segons l'ADNc, l'homologia de la seqüència entre les diferents espècies és molt elevada, sobretot en parts com ara la tríada catalítica, les 5 parelles de cisteïnes i els punts de glicosilació i unió a lípids. Pel càlcul del pI de l'LPL, sempre s'ha fet servir la seqüència a partir de l'ADNc (Holmes et al., 2011). Tanmateix, no ha estat fins al treball d'A. Casanovas (2009a) en què s'ha demostrat empíricament l'existència d'isoformes de pI de l'LPL, distribuïdes en un interval de pH des de 6,5 fins a 8,5 aproximadament.

La diferència entre els valors teòrics de pI de l'LPL i la descripció de les isoformes són les PTM que es produeixen en la proteïna. Les PTM són un conjunt de modificacions covalents a la seqüència d'aminoàcids, les quals poden afectar profundament la funció, estabilitat, activitat, etc. de la nova proteïna. Ja han estat descrites més de 300 PTM i cada vegada prenen més rellevància els estudis de proteòmica i la seva relació amb la funció proteica (Rodríguez-Piñeiro et al., 2007; Vercauteren et al., 2007; Witze et al., 2007). Algunes de les PTM més importants són la glicosilació de proteïnes (relacionada amb processos de senyalització i migració), addició d'ubiquitines (regulació de l'estabilitat, localització cel·lular i degradació),

addició de grups glicosilfosfatidilinositol (localització cel·lular), fosforilació (regulació d'activitat enzimàtica), entre d'altres (Mann and Jensen, 2003).

En l'LPL, a més d'estar àmpliament estudiades les glicosilacions de les asparagines (Augustin et al., 1978; Ben-Zeev et al., 1994; Kobayashi et al., 1994; Simsolo et al., 1992), en publicacions del nostre grup vam descriure que part de la microheterogeneïtat d'isoformes de l'LPL és deguda a diferents nivells de glicosilació, però no a fosforilacions (Casanovas et al., 2009a).

En rata, a més d'haver descrit l'efecte de la glicosilació i la fosforilació sobre el patró d'isoformes de l'LPL, s'ha aconseguit seqüenciar *de novo* part de l'LPL de cor a partir de proteïna purificada parcialment (Casanovas et al., 2009a). En aquest treball, vam assolir un percentatge de cobertura d'entre el 29-37% de la seqüència de la proteïna. Tanmateix, la seqüenciació de les isoformes per separat no va poder donar informació sobre quin conjunt de PTM generen cada isoforma.

En el moment en què vam tenir a la nostra disposició els teixits de macaco de Java, ens vam plantejar l'objectiu de seqüenciar, per primer cop, l'LPL d'aquesta espècie *de novo*. Aquesta informació es podria contrastar amb els resultats obtinguts de la seqüenciació a partir de l'ADNc d'aquesta mateixa espècie. El treball amb mostres de mico no només era interessant pel fet de disposar de gran quantitat de mostra, sinó que també es tracta d'una espècie més propera a l'humà que la de rata (Raisonnier et al., 1995). Per tant, la informació de la seqüència d'aminoàcids de macaco comparteix major similitud amb la seqüència de l'LPL humana, que no pas la seqüència de rata (Holmes et al., 2011).

La descripció del conjunt de PTM responsables de les isoformes de pl de l'LPL també és una característica important a definir. Segons A. Görg (2004), les PTM més importants són les glicosilacions i fosforilacions, així que també vam repetir aquesta anàlisi per confirmar que en macaco es presentava aquesta microheterogeneïtat d'isoformes d'LPL, originada per les mateixes causes que van ser descrites en el cor de rata. A més, calia poder determinar quin conjunt de PTM generava cada isoforma de pl. Per això, disposar de cada isoforma aïllada de la resta permetria aquesta estudi de PTM comparatiu.

2. Objectius específics

Una vegada demostrat que el macaco, com la rata, també presenta isoformes de pl en el teixit adipós blanc, ens plantegem aprofundir en l'origen molecular de les isoformes en aquesta espècie, amb els següents abordatges experimentals:

- Determinar si les isoformes de pl de l'LPL són originades, com a mínim en part, per glicosilacions (com passa en les isoformes de pl de cor de rata) i/o fosforilacions.
- Determinar, per primera vegada, la seqüència de la proteïna LPL d'aquesta espècie. Aïllar les isoformes i seqüenciar-les per separat, per descriure diferències a nivell posttraduccional entre les diferents isoformes de pl de l'LPL.

3. Plantejament experimental per a l'estudi de l'origen

El disseny experimental que vam plantejar per assolir aquests objectius va basar-se majoritàriament en tècniques d'espectrometria de masses i proteòmica. Aquestes tècniques les vam desenvolupar amb el suport del grup de recerca Laboratorio de Proteómica CSIC/UAB.

En tots els objectius, vam plantejar els experiments en teixit de macaco de Java. En l'apartat "6.2. Purificació parcial de l'LPL de teixit adipós blanc de macaco" ja havíem purificat parcialment l'LPL de macaco anteriorment i amb resultats satisfactoris (Figura 45), i per tant, vam decidir treballar amb TAB visceral. Amb aquest tipus de teixit, la complexitat de la mostra era baixa en comparació amb altres teixits, per exemple, cor (Figura 14). El disseny experimental per a cada objectiu va ser:

- A partir de l'LPL parcialment purificada, la mostra es tractaria per eliminar certes PTM. Aquesta mostra tractada la comparariem amb la mostra sense tractar per determinar l'efecte de les PTM en el patró d'isoformes. Per facilitar el treball i millorar els resultats del segon i tercer objectiu, era important disposar de les possibles PTM que vam decidir estudiar a l'objectiu 1. Per aquest motiu, l'inici dels objectius 2 i 3 vam subordinar-los a l'assoliment del primer objectiu.
- Per una banda, el desenvolupament de la seqüenciació de l'LPL el vam plantejar per digestió en líquid amb diferents proteases i anàlisi dels pèptids resultants per espectrometria de masses (LC-MS/MS).
- La seqüenciació de les isoformes posterior a una separació de les isoformes, afegia, respecte el segon objectiu, un pretractament de la reserva obtinguda per cromatografia d'afinitat per aconseguir separar les isoformes. Així, la identificació de PTM anava lligada a una isoforma o dues. Aquest pretractament és l'isoelectroenfocament fora del gel d'acrilamida (*off-gel electrophoresis*, OGE). Posteriorment a l'OGE, les mostres es tractarien de la mateixa manera que el segon objectiu: digestió en líquid i seqüenciació per LC-MS/MS.

Les metodologies amb les quals vam plantejar l'estudi de l'origen de les isoformes de pl de l'LPL suposaven un consum molt elevat de mostra: tractament amb diferents enzims i digestió, enfocament en 2DE,... A més, pel desenvolupament de l'OGE era necessària la posada al punt de la metodologia en proteïna, la qual cosa requeriria diversos assajos (amb el corresponent volum de mostra). També era molt important treballar en tots els casos amb la mateixa reserva a fi de poder correlacionar tots els resultats obtinguts en els diferents assajos. Per tot això, vam decidir treballar amb una reserva generada a partir de diverses purificacions parcials de l'LPL de TAB visceral de macaco.

3.1. Obtenció de la mostra

La mostra des de la qual vam partir per obtenir la reserva de l'LPL és el TAB visceral de macaco de Java obtingut tal i com es descriu en l'apartat de "3.1.2.

Macaco de Java". A partir d'un sol homogeneïtzat de teixit, vam purificar parcialment l'LPL en tres tongades. No vam passar tota la mostra en una sola purificació a fi de no saturar la columna d'heparina-*Sepharose*. D'aquestes tres purificacions només vam estudiar l'eluit a NaCl 1,5 M, ja que el pas de la mostra (NaCl 0,15 M) i el rentat (NaCl 0,75 M) ja els havíem descrit anteriorment (Figura 45), a més d'estalviar temps i reduir residus radioactius.

Vam assolir tres pics d'activitat lipasa d'entre 30 i 50 U/mL en les tres purificacions i de durada, en nombre de fraccions, molt similar. En cap cas, en la quantificació de proteïna total vam obtenir valors superiors al detectable. A partir d'aquests valors, vam generar la reserva de treball per a l'assoliment dels tres objectius. La reserva incloïa fraccions de totes tres purificacions. Aquestes fraccions seguien el criteri utilitzats anteriorment:

- proteïna total no detectable (concentració inferior a 60 µg/mL)
- activitat enzimàtica superior a 10 mU/mL

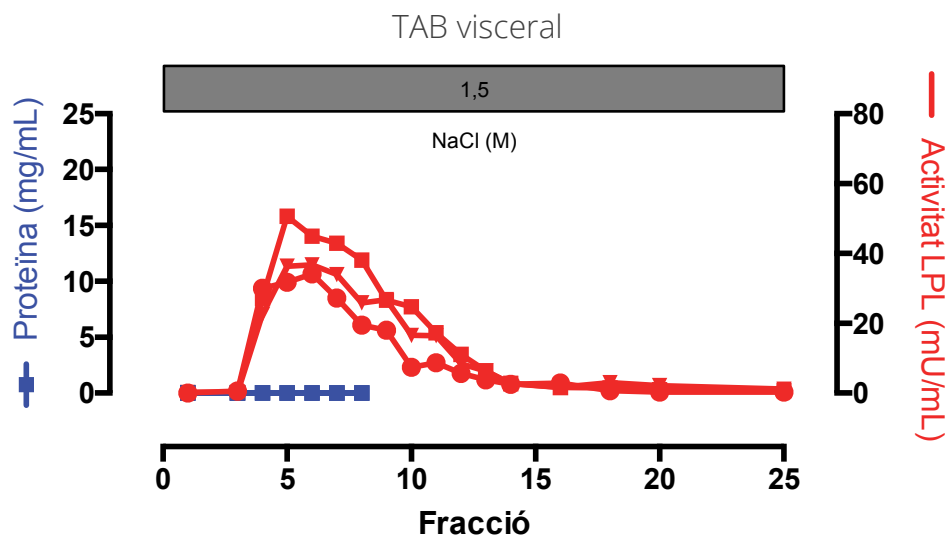


Figura 89. Purificació parcial de l'LPL de TAB visceral de macaco per cromatografia d'afinitat. Tres purificacions independents del mateix homogeneïtzat de teixit, representades per cercles, triangles i quadrats. De diverses fraccions, se'n va quantificar l'activitat lipasa (de color vermell) i la proteïna total (de color blau). Representació de l'eluit a 1,5 M NaCl de cada purificació; el pas de la mostra i el rentat no els vam estudiar. Mostra a partir de 13 animals.

A partir d'aquest moment ja vam disposar d'una mostra prou gran i homogènia per treballar en els experiments per determinar l'origen de les isoformes de pl de l'LPL. Tots els assajos a fer van ser desenvolupats amb aquesta reserva.

4. Modificacions posttraduccional: glicosilació i fosforilació de l'LPL

4.1. Glicosilació

La reserva de TAB visceral de macaco va ser tractada amb una deglicosidasa, tal i com es descriu a l'apartat de materials i mètodes (2.10. Deglicosilació de proteïnes). Breument, uns 20 micrograms de proteïna (equivalent a 1 mL de reserva) van ser precipitats i tractats amb l'enzim. Posteriorment, la reacció es va aturar i les mostres es van enfocar en 1DE, seguidament de WB o Ag.

La deglicosilació de la reserva de TAB, representada a la Figura 90 A i B, va funcionar correctament sobre l'LPL de macaco. Apareix una banda de menor pes molecular en la mostra tractada (Figura 90 A; carril "M+") a diferència de la mostra sense deglicosidar (Figura 90 A; carril "M-"). Curiosament, el temps del tractament no va ser suficient per deglicosidar tota l'LPL de la mostra ("M+"), perquè apareix una banda que manté el pes molecular aparent de l'LPL sense deglicosidar. El temps d'assaig el vam decidir en base a resultats d'anteriors experiments desenvolupats per altres membres del grup. En aquell cas (dades no publicades), la mostra era d'LPL bovina comercial. Com que l'LPL tant bovina com de macaco presenten 2 llocs potencials de glicosilació (Holmes et al., 2011), podria ser que la complexitat (presència d'altres glicoproteïnes) diferís prou com per necessitar temps de reacció diferents. Aquesta doble banda difícilment es podria interpretar com una sub població de l'LPL sense glicosilacions i, per tant, insensibles a la PNGase F. Aquesta opció la vam descartar perquè si existís una LPL sense glicosidar, però amb la mateixa seqüència d'aminoàcids, la diferència de pes causada per la PTM seria evident en una 1DE.

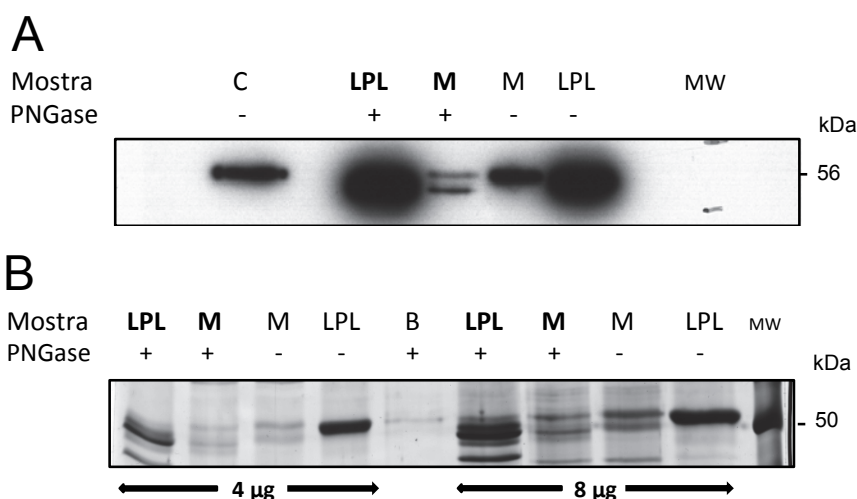


Figura 90. 1DE de l'LPL de TAB de macaco. Reserva tractada amb deglicosidasa (PNGase F) analitzada en WB (A) i Ag (B). C, control positiu del WB; MW, marcador de pes molecular aparent; PNGase +/-, mostra tractada amb deglicosidasa o sense; LPL, control d'LPL comercial bovina; M, mostra de la reserva d'LPL de TAB visceral; B, blanc de mostra. 4 o 8 µg, proteïna total carregada en cada carril. kDa assenyalen el pes molecular aparent de l'LPL (56 kDa) o del marcador de talla (50 kDa) més proper a l'LPL.

En el gel tenyit amb plata, la mostra de l'LPL de macaco tractada amb deglicosidasa (Figura 90 B; carril "M+") es va presentar lleument diferent a la mostra sense tractament (Figura 90 B; carril "M-"). En el cas de la mostra tractada amb l'enzim, es va fer palès la presència de l'LPL tant deglicosidada com encara amb la PTM. En aquesta imatge, gràcies als controls de tractament fets en LPL bovina (Figura 90 B; carrils "LPL"), és molt senzill determinar quina de les bandes és l'LPL no deglicosidada i quina mostra sí que ha estat deglicosidada. La diferència entre totes dues mostres la vam detectar en totes dues càrregues de proteïna del gel (4 i 8 µg de proteïna total).

A partir dels resultats 1DE-WB vam calcular quin percentatge de pes representaven les glicosilacions respecte el total de la proteïna (Taula 9).

Pes molecular aparent (kDa) de la mostra		% pes de les glicosilacions
M+	M-	
54,65	59,98	9%

Taula 9. Variació de pes molecular de l'LPL de macaco pel tractament amb deglicosidasa. Resultats a partir de la **Figura 90 A**. M, reserva d'LPL de TAB de macaco; +/-, mostra tractada amb deglicosidasa (PNGase F) o sense.

La variació de pes deguda a la deglicosilació de la proteïna va resultar ser d'un 9%. Aquests resultats són coherents amb els anteriorment descrits: la variació és de 7,9% en l'LPL de cor de rata (Casanovas et al., 2009a) i del 8% en el cas de l'LPL provinent de plasma post-heparínic humà (Augustin et al., 1978). A partir d'aquestes dades i de l'elevat grau de conservació de la seqüència d'aminoàcids de l'LPL entre diferents espècies (Holmes et al., 2011; Raisonier et al., 1995), podem suposar que l'LPL de macaco de Java tindrà els mateixos punts de glicosilació: dues asparagines en la seqüència Asn-X-Ser/Thr en les posicions, aproximadament, 44 i 361.

Després d'haver confirmat la correcta deglicosilació de la proteïna en la reserva d'LPL de macaco, vam utilitzar la mateixa mostra per fer la 2DE-WB. D'aquesta manera, en comparació a la mostra sense tractar, podríem saber si la glicosilació de proteïnes afectava al nombre d'isoformes de pl de l'LPL.

L'anàlisi per 2DE-WB del patró de l'LPL deglicosidada va mostrar que encara eren presents les isoformes de pl (Figura 91), però el nombre d'isoformes es va veure clarament reduït. Van ser les isoformes més àcides que van desaparèixer. En rata ja està demostrat que aquesta PTM afecta de la mateixa forma al patró d'isoformes de l'LPL de cor de rata (Casanovas et al., 2009a).

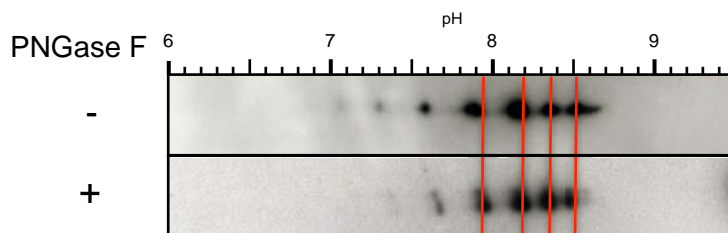


Figura 91. 2DE de l'LPL de TAB de macaco amb deglicosidasa. Mostra tractada amb deglicosidasa (PNGase F) (+) o sense tractar (-), enfocades en tires d'IEF de pH 6-11 en 11cm i resoltes per WB contra LPL. Es van carregar fins a 300 µg de proteïna total per assaig. Les línies vermelles marquen el patró de la mostra tractada.

En aquest assaig (Figura 91), en relació amb els resultats obtinguts en l'anàlisi en 1DE (Figura 90), el tractament de l'LPL amb la PNGase F va aconseguir deglicosidar tota la proteïna, ja que en la imatge del WB no es veuen els dos conjunts d'isoformes (els tractats, de menor pes molecular; els no tractats, de major pes molecular aparent) que s'haurien de veure segons la 1DE-WB. Per tant, podem confirmar que l'enzim és capaç de deglicosidar la totalitat de l'LPL present a la mostra.

Amb aquests resultats vam confirmar que l'LPL del macaco de Java és una glicoproteïna i que la glicosilació de l'LPL és en part responsable de l'origen de les isoformes de pI de l'LPL. Existeixen precedents de proteïnes que part de la seva diversitat d'isoformes de pI és deguda a la glicosilació (Kleinert et al., 2007), i coincideixen en què la deglicosilació de la proteïna desplaça les isoformes cap a pI més bàsic. Aquest fet es pot justificar per la pèrdua d'àcid siàlic del glicans: segons el nombre d'àcids siàlics presents en la glicosilació, el pI de l'isoforma pot variar (de Jong and van Eijk, 1988). Així, les isoformes que s'han perdut en el tractament amb PNGase F de la reserva poden ser originades per la seva glicosilació més l'addició d'un nombre variable d'àcids siàlics. Tanmateix, la reserva tractada amb deglicosidasa presenta encara isoformes de pI a pH més bàsics i, per tant, altres PTM són les causants de les restants isoformes de pI de l'LPL.

4.2. Fosforilació

De la mateixa manera que vam estudiar la glicosilació de l'LPL com a PTM, també vam estudiar la fosforilació de l'LPL, ja que aquesta PTM està àmpliament descrita com a mecanisme de regulació de molts enzims. Tanmateix, la variació de pes molecular aparent és tan petita (80 Da) que la variació que pot causar en 1DE no és significativa. Per això, vam fer directament un assaig de 2DE resolt en WB de la reserva tractada o no amb fosfatasa alcalina (AP).

El resultat de la defosforilació de la reserva de macaco de Java va demostrar que les isoformes de l'LPL no són degudes a fosforilacions. En les imatges obtingudes, vam obtenir el mateix nombre d'isoformes de pI en la reserva tractada que en el control (Figura 92). La fosforilació és un mecanisme de regulació àmpliament descrit. Però és un procés ràpid i reversible, el qual afecta sobretot a proteïnes citoplasmàtiques. Per aquest motiu, no és sorprenent que l'origen de les

isoformes de pI de l'LPL no sigui la fosforilació: l'enzim fisiològicament actiu es troba a la paret de l'endoteli, on difícilment es poden controlar els processos de fosforilació/defosforilació. Aquest comportament en les isoformes de pI de l'LPL és el mateix descrit en les isoformes del cor de rata, les quals tampoc varien per l'efecte de la fosfatasa alcalina (Casanovas et al., 2009a).

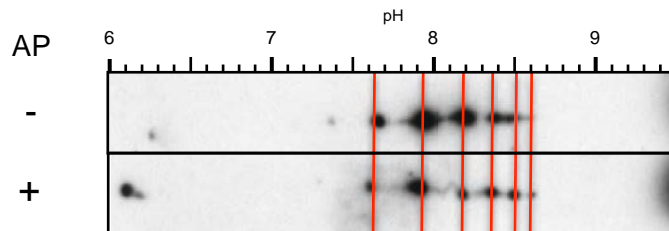


Figura 92. 2DE de l'LPL de TAB de macaco amb fosfatasa alcalina. Mostra tractada amb fosfatasa alcalina (AP) (+) o sense tractar (-), enfocades en tires d'IEF de pH 6-11 en 11cm i resoltes per WB contra LPL. Es van carregar fins a 300 µg de proteïna total per assaig. Les línies vermelles marquen el patró de la mostra tractada.

Una diferència entre tots dos patrons va ser l'abundància relativa de les isoformes: en la mostra tractada amb AP semblava que certes isoformes fossin menys abundants. Una possibilitat era que s'hagués defosforilat parcialment les isoformes, tal i com havia passat en la deglicosilació en 1DE. Però per a la tècnica emprada, vam desenvolupar diversos mètodes que poden afegir variabilitat als resultats obtinguts (precipitació, IEF, etc.). Per tot això, les variacions d'abundància relativa les vam considerar per altres aspectes metodològics independents a la defosforilació.

En conclusió, l'heterogeneïtat de les isoformes de pI de l'LPL de macaco de Java el podem atribuir parcialment a la glicosilació de la proteïna. Aquests resultats confirmen els obtinguts experimentalment per A. Casanovas (2009a), en què va demostrar de la mateixa manera la implicació de la glicosilació de l'LPL en l'origen de les isoformes. A més, també hem confirmat la glicosilació de la seqüència de l'LPL per 2 punts, tal i com es descriu a la bibliografia en altres espècies (Augustin et al., 1978; Ben-Zeev et al., 1994; Kobayashi et al., 1994; Simsolo et al., 1992). Com es va concloure també en l'estudi de les isoformes de pI en cor de rata, la fosforilació no és la causant de cap isoforma del patró de l'LPL de macaco de Java.

5. Seqüenciació de l'LPL de macaco de Java

5.1. Digestió en gel

En l'anàlisi de la reserva de l'LPL deglicosidada (Figura 90) vam generar tot un seguit de bandes per 1DE tenyides amb plata. Aquesta mostra representava el conjunt de proteïnes de la reserva de macaco amb glicosilacions i sense, la qual vam utilitzar per iniciar la seqüenciació de l'LPL de macaco *de novo*.

Vam seleccionar les bandes que havíem detectat en el WB com a LPL. En ser una mostra en gel, només vam poder fer la digestió amb tripsina. Tanmateix, els resultats de l'anàlisi de proteïnes per mapatge peptídic no ens van donar informació sobre la presència o no d'LPL, ja que no es van detectar la presència de pèptids tríptics corresponents a l'LPL (dades no mostrades).

5.2. Digestió en líquid

Per iniciar la seqüenciació de l'LPL present en la reserva de TAB visceral de macaco (Figura 90 - A), vam fer la digestió de la reserva en líquid. Aquest assaig el vam fer sense reduir la complexitat de la mostra prèviament a la digestió. D'aquesta manera obtindríem un conjunt de pèptids provinents de tot el conjunt de proteïnes de la reserva. Un avantatge d'aquesta tècnica és la possibilitat d'ús d'altres proteases a més de la tripsina, com per exemple la quimotripsina, LysC, LysN, AspN, GluC o ArgC. A més, després dels resultats obtinguts en la deglicosilació de l'LPL (Figura 91), sobre l'origen de les isoformes de pI, vam decidir incloure una nova variable en la seqüenciació de l'LPL *de novo*: la deglicosilació de la reserva prèvia digestió amb les proteases.

A la Figura 93 es mostra el resum dels resultats obtinguts en la digestió de la reserva d'LPL de TAB visceral de macaco per dues proteases seguida de l'anàlisi per LC-MS. Aquesta aproximació va donar informació de la seqüenciació de l'LPL *de novo*. A partir dels diferents pèptids obtinguts i de la seqüència teòrica de l'LPL vam generar l'alineament de les dues seqüències (Figura 93).

El sumatori de les diferents digestions va resultar ser el 71,9% de cobertura de la proteïna. En analitzar la seqüència obtinguda, vam poder confirmar la seqüència consens Asn-X-Ser/Thr (Medzihradzsky, 2008) per a la glicosilació de l'asparagina Asn44, però no per l'altre potencial lloc de glicosilació, Asn360. Una altra candidata a la glicosilació era l'asparagina Asn258, però no va ser possible perquè presentava la seqüència Asn-Pro-Thr i l'aminoàcid que segueix l'asparagina pot ser qualsevol excepte una prolina. Per homologia, també vam poder confirmar la presència de les tirosines Tyr95 i 165. Aquestes dues tirosines, juntament amb la teòrica Tyr317 estan descrites, en rata, com a nitrotirosines en resposta a l'administració d'LPS (Casanovas et al., 2009b).

Seqüenciació de l'LPL

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	
M	R	K	K	R	R	D	F	I	D	I	E	S	K	F	A	L	R	T	P	E	D	T	A	E	D	T	C	H	L	I	P	G	V	A	
						D	F	I	D	I	E	S	K	F	A	L	R	T	P	E	D	T	A	E	D	T	C	H	L	I	P	G	V	A	
36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	
E	S	V	A	T	C	H	F	N	H	S	S	K	T	F	M	V	I	H	G	W	T	V	T	G	M	Y	E	S	W	V	P	K	L	V	
E	S	V	A	T	C	H	F	N	H	S	S	K	T	F	M	V	I	H	G	W	T	V	T	G	M	Y	E	S	W	V	P	K	L	V	
71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	
A	A	L	Y	K	R	E	P	D	S	N	V	I	V	V	D	W	L	S	R	A	Q	Q	H	Y	P	V	S	A	G	Y	T	K	L	V	
						R	E	P	D	S	N	V	I	V	V	D	W	L	S	R	A	Q	Q	H	Y	P	V	S	A	G	Y	T	K	L	V
106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	
G	Q	D	V	A	R	F	I	N	W	M	E	E	E	F	N	Y	P	L	D	N	V	H	L	L	G	Y	S	L	G	A	H	A	A	G	
G	Q	D	V	A	R	F	I	N	W	M	E	E	E	F	N	Y	P	L	D	N	V	H	L	L	G	Y	S	L	G	A	H	A	A	G	
141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	
I	A	G	S	L	T	N	K	K	V	N	R	I	T	G	L	D	P	A	G	P	N	F	E	Y	A	E	A	P	S	R	L	S	P	D	
I	A	G	S	L	T	N	K	K				I	T	G	L	D	P	A	G	P	N	F	E	Y	A	E	A	P	S	R	L	S	P	D	
176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	
D	A	D	F	V	D	V	L	H	T	F	T	R	G	S	P	G	R	S	I	G	I	Q	K	P	V	G	H	V	D	I	Y	P	N	G	
D	A	D	F	V	D	V	L	H	T	F	T	R	G	S	P	G	R	S	I	G	I	Q	K	P	V	G	H	V	D	I	Y	P	N	G	
211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	
G	T	F	Q	P	G	C	N	I	G	E	A	I	R	V	I	A	E	R	G	L	G	D	V	D	Q	L	V	K	C	S	H	E	R	S	
G	T	F	Q	P	G	C	N	I	G	E	A	I	R				R	G	L	G	D	V	D	Q	L	V	K	C	S	H	E	R	S		
246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	
I	H	L	F	I	D	S	L	L	N	E	E	N	P	S	K	A	Y	R	C	S	S	K	E												
I	H	L	F	I	D	S	L	L	N	E	E	N	P	S	K	A	Y	R	C	S	S	K	E												
281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	
K	N	R	C	N	N	L	G	Y	E	I	N	K	V	R	A	K	R	S	S	K	M	Y	L	K	T	R	S	Q	M	P	Y	K	V	F	
K	N	R	C	N	N	L	G	Y	E	I	N	K																							
316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	
H	Y	Q	V	K	I	H	F	S	G	T	E	S	E	T	H	T	N	Q	A	F	E	I	S	L	Y	G	T	V	A	E	S	E	N	I	
H	Y	Q	V	K	I	H	F	S	G	T	E	S	E	T	H	T	N	Q	A	F	E	I	S	L	Y	G	T	V	A	E	S	E	N	I	
351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	
P	F	T	L	P	E	V	S	T	N	K	T	Y	S	F	L	I	Y	T	E	V	D	I	G	E	L	L	M	L	K	L	K	W	K	S	
P	F	T	L	P	E	V	S	T	N	K	T	Y	S	F	L	I	Y	T	E	V	D	I	G	E	L	L	M	L	K	L	K	W	K	S	
386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	
D	S	Y	F	S	W	S	D	W	W	S	S	P	G	F	A	I	Q	K	I	R	V	K	A	G	E	T	Q	K	K	V	I	F	C	S	
D	S	Y	F	S	W	S	D	W	W	S	S	P	G	F	A	I	Q	K								T	Q	K	K	V	I	F	C	S	
421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449							
R	E	K	V	S	H	L	Q	K	G	K	A	P	A	V	F	V	K	C	H	D	K	S	L	N	K	K	S	G							
R	E	K	V	S	H	L	Q	K	G	K	A	P	A	V	F	V	K	C	H	D	K	S	L	N	K	K	S	G							

Figura 93. Alineament de la seqüenciació de l'LPL de macaco. Digestió en líquid de la reserva d'LPL de macaco (deglicosidada o sense) amb dues proteases (tripsina i GluC). Els resultats de la LC-MS/MS es van alinear amb la seqüència obtinguda per "lipoprotein lipase" de *Macaca fascicularis* a la base de dades UniProtKB (Q95KN9_MACFA), en fons en negre. De color taronja, són els pèptids només detectats amb tripsina; en verd, mitjançant GluC; en fons blanc quan totes dues proteases detecten aquell pèptid precursor. Els aminoàcids de color vermell són descrits com a modificables posttraduccionalment: nitrotirosines (Y) o N-glicosilacions (N).

Per tractament amb les proteases i deglicosilació de la reserva d'LPL, els percentatges de cobertura obtinguts en la Figura 93 van ser de:

Tractament		Aminoàcids d'LPL seqüenciats			
Proteasa	Glicosidasa	Totals	%	Exclusius	%
Tripsina	-	146	32,5	0	0
	+	260	57,9	104	23,2
GluC	-	44	9,8	0	0
	+	121	26,9	40	8,9

Taula 10. Nombre d'aminoàcids seqüenciats en diferents combinacions de tractament enzimàtic. Segons cada tractament de la reserva d'LPL de macaco, vam obtenir diferent nivell de cobertura de la seqüenciació de l'LPL. Els aminoàcids exclusius de cada tractament són aquells que només s'han confirmat en aquella condició. La seqüència de l'LPL de macaco conté 449 aminoàcids.

Segons els resultats de la Taula 10, el tractament de la reserva amb glicosidasa prèviament a la digestió amb qualsevol de les dues proteases va augmentar no només el percentatge total de cobertura de seqüenciació, sinó que també van presentar un elevat nombre d'aminoàcids descrits exclusivament amb aquest mètode. En el cas de la tripsina, va augmentar en un 25% mentre que per la Glu C va ser del 15%. Aquest augment de la cobertura en les mostres deglicosidades és coherent amb la bibliografia: està descrit que la glicosilació de proteïnes redueix la sensibilitat a proteases (Langsford et al., 1987; Mutero and Fournier, 1992; Raju and Scallon, 2006).

Per tant, per l'LPL, també la glicosilació podria reduir la sensibilitat a la tripsina i a la Glu C i, en retirar les glicosilacions de l'LPL, les proteases poden generar més pèptids per a ser seqüenciats. La informació de la seqüència obtinguda ens dona pistes sobre la possible localització d'una de les N-glicosilacions de l'LPL, així com de tirosines descrites com a potencialment modificables posttraduccionalment (Casanovas et al., 2009b). Les glicosilacions de l'LPL ha estat àmpliament descrites tant en humans (Augustin et al., 1978) com en altres espècies (Holmes et al., 2011; Hoogewerf and Bensadoun, 1991; Yang et al., 1989). La presència d'aquesta PTM és vital en tots els casos, per al correcte funcionament de l'LPL, ja que en cas de defecte en la N-glicosilació, l'LPL ni arriba a ser secretada ni és funcional (Ben-Zeev et al., 1994; Kobayashi et al., 1994; Simsolo et al., 1992). Per tant, a partir dels resultats obtinguts en altres espècies, podem pensar que la glicosilació de l'Asp44 (confirmada la seqüència) de l'LPL de macaco sigui clau per al correcte funcionament de l'enzim. En canvi, l'Asp360 (no confirmada) no sembla ser vital per al correcte funcionament fisiològic de l'LPL.

En altres espècies, també s'ha obtingut la seqüenciació de l'LPL *de novo*, com la de cor de rata (Casanovas et al., 2009a) o la de llet de vaca (Yang et al., 1989). En el cas de l'LPL de cor de rata, treball desenvolupat pel nostre grup, es va treballar amb la mostra sense deglicosidar i es va assolir fins a un 37% de la cobertura. Aquests resultats són coherents amb els nostres obtinguts en la

digestió en líquid, ja que vam obtenir un valor del 32% de cobertura en la digestió amb tripsina sense deglicosidar.

Lamentablement, el procés de seqüenciació *de novo* de l'LPL és poc habitual i no es disposen de més dades experimentals de la seqüència de l'LPL. En canvi, la informació a partir de l'ADNc ha estat, juntament amb les homologies a la lipasa pancreàtica (van Tilbeurgh et al., 1994), la forma de treballar amb la seqüència de l'LPL en altres espècies.

Malauradament, en el procés de seqüenciació no va ser possible detectar cap PTM addicional. En l'algoritme de cerca i seqüenciació dels resultats obtinguts en el LC-MS/MS, vam descartar les glicosilacions i fosforilacions perquè ja les havíem estudiat prèviament. A canvi, vam incloure com a PTM possibles les acetilacions de les lisines i les nitracions de les tirosines. Aquestes dues PTM són processos força freqüents i relacionats amb processos de senyalització i regulació. El resultat negatiu en aquesta cerca es pot entendre perquè el total de pèptids en un estat de modificació posttraduccional és possible que siguin una petita part del total del producte del gen. A més, no se seqüencia el total de la població de pèptids tríptics. Aquest fet està justificat en l'article de B. M. Oliveira (2014), en què s'explica la necessitat de complementar l'anàlisi de PTM per digestió en líquid amb l'estudi per 2DE.

Per haver treballat amb la digestió en líquid de la reserva, vam haver de predeterminar quins eren els pèptids que se seqüenciarien: del conjunt de proteïnes presents a la reserva, només seleccionàrem els pèptids provinents de la digestió de l'LPL. És per això que pèptids que no van correspondre amb la relació m/z esperada no van ser seleccionats per seqüenciar. I, per tant, pèptids que continguin PTM que modifiquessin la massa o càrrega del pèptid teòric no van ser seleccionats. Com a conseqüència d'haver treballat amb la digestió en líquid, vam perdre part de la capacitat de cerca de PTM. Però a canvi, hem pogut treballar amb dues proteases i no tenim les limitacions inherents al fet de treballar amb mostres incloses en gels de poliacrilamida, que permet utilitzar únicament amb una proteasa (tripsina).

6. Aïllament de les isoformes de pI de l'LPL de macaco de Java

6.1. Isoelectroenfocament en líquid: resolució teòrica

Primer de tot, vam resoldre teòricament un OGE (Figura 94) per estimar quina seria la distribució de les isoformes en les fraccions de l'IEF. A partir dels pI de les isoformes obtinguts en anteriors 2DE de TAB visceral de macaco (Figura 48), vam concloure que en treballar en tires d'IEF de pH 6-9 en 24 cm no només s'inclourien totes les isoformes, sinó que totes possiblement quedarien en compartiments separats.

A)

Fra.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
pH	6,00	6,13	6,25	6,38	6,50	6,63	6,75	6,88	7,00	7,13	7,25	7,38	7,50	7,63	7,75	7,88	8,00	8,13	8,25	8,38	8,50	8,63	8,75	8,88
LPL										1		1		1			1		1	1		1		1

B)

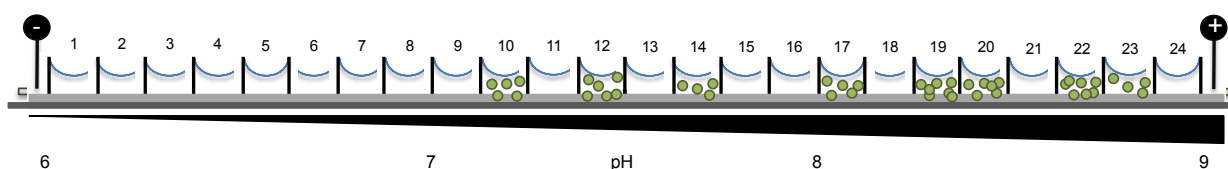


Figura 94. Resultat teòric de l'OGE de l'LPL de TAB de macaco. Distribució en una tira d'IEF de pH 6-9 en 24 cm de les isoformes de pI de l'LPL de TAB de macaco. Valors de pI de les isoformes de l'LPL obtinguts a partir d'assajos previs (**Figura 48**). (A) Interval·ls de pH de cada fracció de l'assaig (pH) amb el nombre d'isoformes (LPL) incloses a cadascuna i (B) representació esquemàtica del resultat final estimat de la distribució de les isoformes de l'LPL en l'OGE.

6.2. Isoelectroenfocament en líquid: posada al punt

El primer assaig d'OGE el vam desenvolupar segons les especificacions que el Laboratorio de Proteómic CSIC/UAB havia determinat en la posada al punt per pèptids d'aquesta metodologia. Tanmateix, Agilent Technologies, el fabricant de l'aparell, limitava la quantitat de proteïna que podíem carregar en cada assaig: mentre que la tira d'IEF podia suportar grans quantitats de proteïna total (400-2000 µg), aquest protocol recomanava carregar uns 50 µg de proteïna pura.

Per a l'anàlisi del primer OGE dut a terme (Figura 95), vam estudiar la presència d'LPL en 1DE-WB en totes les fraccions obtingudes (només des d'1 fins a 23, ja que la fracció 24 va resultar sense prou volum). Aquesta anàlisi va incloure tot l'interval de pH, des de 6 fins a 9.

Tot i no detectar-se de forma clara, vam poder determinar la presència de certa quantitat d'LPL, sobretot en fraccions properes a les teòriques segons els resultats de la Figura 94 – A: fraccions 12, 13, 15, 17 i 19.

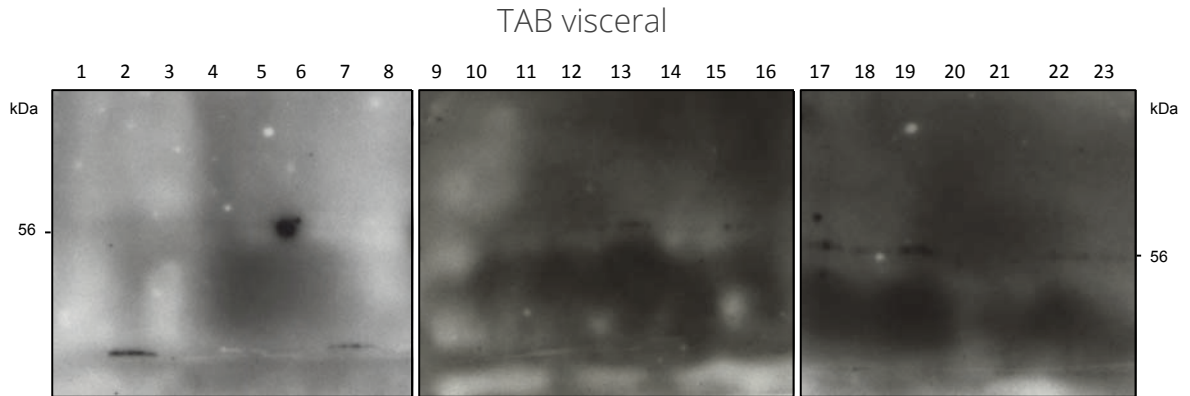


Figura 95. 1DE de les fraccions de l'OGE de l'LPL de macaco amb 50 µg de proteïna. Enfocament en una tira d'IEF de pH 6-9 en 24 cm. Immunodetecció de l'LPL present en cada fracció. 1-23, fraccions de l'OGE, des de pH6 (fracció 1) a pH 9 (fracció 23). kDa assenyalava el pes molecular aparent de l'LPL (56 kDa).

Per la intensitat del senyal, vam deduir que part de l'LPL havia quedat retinguda en la tira d'IEF. Vist el resultat del primer OGE, vam fer l'SDS-PAGE de dues terceres parts de la tira d'IEF: el primer terç, que inclouria l'interval on teòricament no hi havia LPL (pH 6-7); el segon, que tindria les isoformes més abundants (pH 8-9). El resultat d'aquesta aproximació (Figura 96) és que no vam obtenir cap senyal de l'LPL, on no n'esperàvem ni on n'hi hauria d'haver.

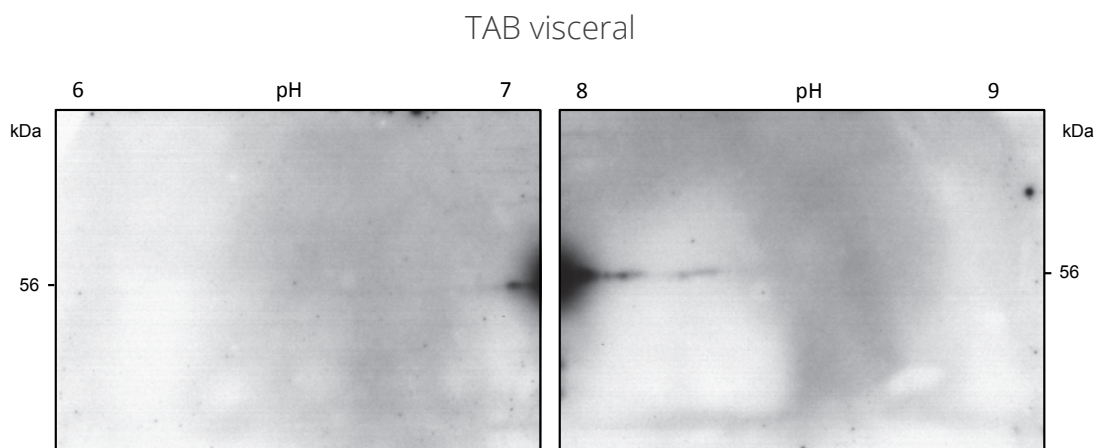


Figura 96. 1DE de les tires d'IEF de l'OGE de l'LPL de macaco. OGE desenvolupat en una tira de pH 6-9 en 24 cm. En finalitzar l'assaig, es va partir la tira en 3 parts iguals. Immunodetecció de l'LPL retinguda en la tira d'IEF en finalitzar l'OGE en els intervals de pH de 6 a 7 i de 8 a 9. kDa assenyalava el pes molecular aparent de l'LPL (56 kDa).

El fet de no detectar LPL retinguda a la tira no volia dir que l'IEF no hagués funcionat. Aquest era un resultat esperable, ja que el volum de líquid en comparació al volum de la tira és molt superior i, per tant, la majoria de mostra es desplaça cap al líquid de les fraccions. Teòricament, una vegada la mostra està en equilibri, més del 96% de la proteïna es troba al líquid i el percentatge restant, a la tira (Franchin et al., 2014)

Així, els resultats del primer assaig d'OGE semblaven indicar que l'LPL s'havia enfocat més o menys correctament, però que la quantitat de mostra (50 µg de proteïna total) no era la suficient per a detectar-la posteriorment en 1DE-WB. Per això, vam plantejar repetir l'assaig però augmentant la quantitat de mostra. D'aquesta manera, assegurariem la detecció de l'LPL posteriorment a l'enfocament, però sobrepassaríem el límit de proteïna recomanat per les instruccions de la metodologia. Tanmateix, aquesta limitació se centra en proteïnes pures. Per l'experiència en altres purificacions de TAB de macaco i de rata, la complexitat d'aquestes reserves va ser baixa (Figura 15 i Figura 47), però no es pot dir que fos LPL pura. Per tant, la limitació de quantitat de proteïna la podríem forçar per tal d'afavorir la detecció de l'LPL enfocada.

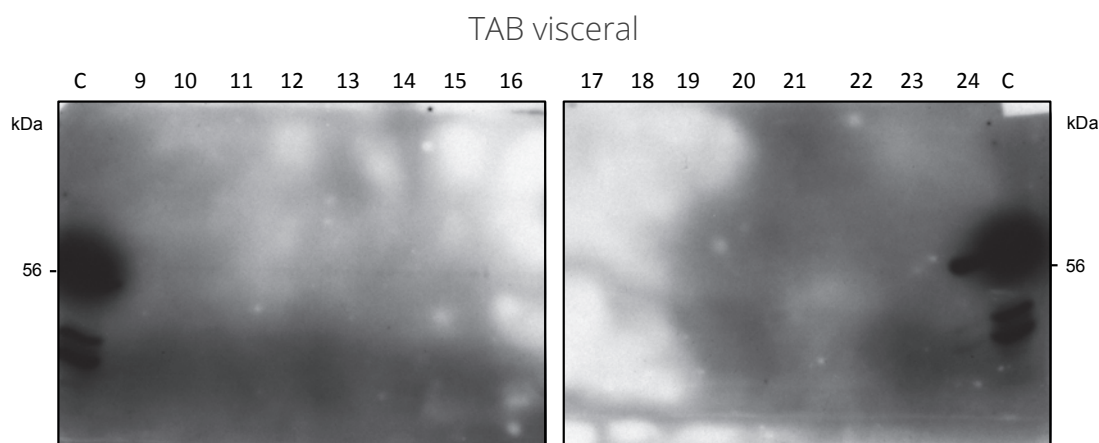


Figura 97. 1DE de les fraccions de l'OGE de l'LPL de macaco amb 100 µg de proteïna. Enfocament en una tira d'IEF de pH 6-9 en 24 cm. Immunodetecció de l'LPL present en cada fracció. C, control positiu d'LPL bovina; 9-24, fraccions de l'OGE, des de pH 7 (fracció 9) a pH 9 (fracció 24). kDa assenyalava el pes molecular aparent de l'LPL (56 kDa).

Una vegada realitzat l'enfocament de les mostres en OGE amb 100 µg de proteïna total, vam fer l'anàlisi de les fraccions obtingudes. La imatge de la Figura 97 mostra la immunodetecció de l'LPL de les fraccions que comprenien l'interval de pH de distribució de l'LPL, des de pH 7 a 9. Teòricament, l'OGE podria haver resultat de dues maneres: la primera és que l'LPL s'hagués enfocat correctament i només aparegués en certes fraccions (Figura 94); l'altra resolució és que l'OGE no hagués funcionat correctament i que la mostra no s'hagués enfocat segons el seu pI, per la qual cosa hauríem de veure l'LPL per totes les fraccions. En aquest cas, no vam detectar LPL en cap de les fraccions. Per tant, no només l'LPL no semblava no haver-se enfocat correctament, sinó que tampoc érem capaços de recuperar-la posteriorment a l'enfocament en líquid.

6.3. Discussió: isoelectroenfocament en líquid

Els resultats obtinguts fins ara són totalment contradictoris amb l'àmplia bibliografia que utilitza la tècnica de l'OGE en altres proteïnes amb resultats satisfactoris (Magdeldin et al., 2014; Martin-Bernabe et al., 2014; Michel et al., 2003; Norris et al., 2016; Ros et al., 2002). Per exemple, A. Ros (2002) va fraccionar en OGE proteïnes d'*E. coli* en un interval específic de pH i va reproduir una fracció en 2DE en comparació a la 2DE de la mostra sense fraccionar. En aquest cas, la fracció enfocada en 2DE va ser molt similar a la mostra sense fraccionar, tant per pI com per nombre de taques. També, S. Magdeldin (2014) va millorar significativament la identificació de proteïnes de ronyó de ratolí fent un fraccionament previ de la mostra.

Per altra banda, recentment han estat publicats treballs en què es descriuen aspectes negatius de la metodologia, d'entre els quals hem de destacar que l'OGE requereix un elevat consum de proteïna i que es perd més mostra que en l'enfocament *in-gel* (Moreda-Pineiro et al., 2014). A més, també s'han descrit problemes en la recuperació de la mostra de la tira d'IEF i la mala correlació entre el pI teòric i el pI experimentals dels pèptids enfocats (Franchin et al., 2014): els resultats descriuen dues poblacions de pèptids, segons s'analitzi la població present a la fracció líquida o retinguda a la tira.

Per tant, sembla que el treball amb OGE s'ha de desenvolupar amb mostres d'elevada complexitat i concentració de proteïnes, on la pèrdua de mostra no sigui vital. Una opció per poder abordar l'aproximació a les PTM de les isoformes de pI de l'LPL de macaco mitjançant l'OGE és treballar amb el cor. Per aquest teixit també hem aconseguit purificar-ne parcialment l'LPL en rata i la complexitat de la reserva va ser més elevada que en TAB (Figura 14). També, les proteïnes objectiu (en el nostre cas, isoformes de pI de l'LPL) han de ser d'abundància relativa elevada, ja que les menys abundants es poden perdre durant la metodologia. Per tot això, ara per ara, obtenir les isoformes de pI de l'LPL mitjançant l'isoelectroenfocament en líquid no és viable, i cal millorar la tècnica pel que fa a la reproductibilitat, a la sensibilitat i al rendiment de recuperació de la mostra.

7. Discussió: origen

A partir del descobriment de les isoformes de pl de l'LPL, ens vam plantejar quins són els mecanismes que les generen. La causa havia de ser a partir del nivell posttraduccional, ja que l'LPL prové d'un sol gen i no està descrit cap procés de maduració alternativa de l'ARNm.

En el mateix treball del descobriment de les isoformes del nostre grup de recerca (Casanovas et al., 2009a), ja es va determinar que en rata, aquestes isoformes són parcialment degudes a la glicosilació de la proteïna i que la fosforilació no hi juga cap paper. Aquests resultats els hem demostrat també en el cas de l'LPL de macaco de Java: en eliminar les glicosilacions de la proteïna, el nombre d'isoformes es veu reduït considerablement. També, la fosforilació de l'LPL no intervé en la formació de les isoformes de pl. A més, gràcies a la seqüenciació directa de la proteïna, hem pogut confirmar l'existència d'una regió amb la seqüència d'aminoàcids consens per a l'N-glicosilació de l'LPL de macaco.

La similitud entre totes dues espècies (rata i macaco), pel que fa a l'efecte de l'N-glicosilació de la proteïna, es pot explicar perquè l'LPL és una proteïna molt conservada entre diferents espècies (Holmes et al., 2011). De fet, la seqüència d'aminoàcids que, potencialment, pot patir una N-glicosilació és una de les característiques més conservades a nivell de gen entre diverses espècies (Raisonnier et al., 1995).

Així com per altres PTM no podem assegurar-ne la presència en totes les isoformes de pl, de la glicosilació de l'LPL sí que ho podem afirmar. Com que la glicosilació de la seqüència d'aminoàcids fa augmentar el pes molecular aparent de l'LPL de forma significativa (8% d'augment de pes), si alguna isoforma no estigués glicosilada, s'hauria pogut detectar en l'electroforesi en una dimensió (pes molecular): apareixeria una banda de menor pes molecular en les imatges obtingudes per immunodetecció.

L'N-glicosilació de proteïnes és un procés molt habitual, sobretot associat a proteïnes de secreció o de membrana i a funcions de regulació (Mann and Jensen, 2003), per això no és estrany que l'LPL sigui una glicoproteïna. També la glicosilació de proteïnes és un causant de l'heterogeneïtat d'isoformes de pl de proteïnes. Per exemple, la proteïna C9 del complement humà té descrites més de 15 isoformes de pl (Franc et al., 2017). Totes les isoformes són causades per la complexitat en la ramificació de la glicosilació.

Mitjançant la seqüenciació de la proteïna, hem descrit fins a un 72% de la seqüència primària de l'LPL de macaco. Anteriorment, en el nostre grup de treball vam poder descriure un 29-37% de la cobertura de l'LPL de cor de rata. Aquesta millora en el percentatge de cobertura és deguda, en part, a la combinació de diferents proteases, però sobretot a la deglicosilació de la proteïna. Altres autors també han descrit la millora en l'efecte de proteases després de tractar les mostres per deglicosidar-les (Langsford et al., 1987; Raju and Scallan, 2006). De fet, el percentatge de cobertura obtingut en la mostra sense deglicosidar és el mateix que es va obtenir anteriorment, en la seqüenciació de l'LPL de cor de rata (Casanovas et al., 2009a).

Hem pogut confirmar la presència d'importants aminoàcids en la proteïna LPL, en relació a l'origen de les isoformes de pl. Un exemple ja citat és la presència d'una seqüència d'N-glicosilació (Asp44). Aquesta PTM està descrita com a vital per a la correcta secreció i funcionament de l'LPL ((Ben-Zeev et al., 1994; Kobayashi et al., 1994; Simsolo et al., 1992). L'altre punt d'N-glicosilació de l'LPL (Asp360) que ha estat descrit teòricament, no s'ha pogut confirmar a partir de la seqüenciació directa de l'LPL. Aquesta PTM no es considera vital per al correcte funcionament de l'enzim. A més, també hem descrit la presència de tirosines (Tyr95 i Tyr165), les quals poden estar implicades en la regulació ràpida per òxid nítric en teixit adipós, en resposta a la injecció d'LPS (Casanovas et al., 2009b; Ricart-Jane et al., 2008).

Tot i que podem assegurar la presència de les dues N-glicosilacions en totes les isoformes, encara hi ha altres PTM que causen la diversitat d'isoformes després d'haver deglicosilat la proteïna, ja que encara es poden detectar fins a 5 isoformes de pl de l'LPL. Aquestes PTM no són presents a totes les isoformes: cada pl de cada isoformes és el resultat d'un conjunt específic de modificacions a la seqüència d'aminoàcids. Per tant, la freqüència d'una certa PTM pot ser relativament baixa. Disposar de la seqüència d'aminoàcids que formen l'LPL de macaco ens ofereix un suport a l'hora de buscar possibles PTM de menor freqüència, ja que les cerques poden ser més acurades.

La tecnologia de l'enfocament en líquid de les mostres, l'OGE, està encara en etapes de desenvolupament. Certament, diversos estudis han aplicat aquesta metodologia per obtenir millores significatives en els seus resultats (Magdeldin et al., 2014; Ros et al., 2002), però l'OGE també té descrits diversos aspectes tèrbols (p.e. mala recuperació de la mostra, mala correlació entre els pl observats i els esperats,...). Aquests factors, juntament amb la complexitat de l'LPL (ja hem comentat la impossibilitat d'immunoprecipitar-la, segurament per característiques físico-químiques de l'LPL), han conduït el desenvolupament experimental del fraccionament de les isoformes de pl de l'LPL en un atzucac.

8. Conclusions : origen

- Hem descrit que les isoformes de pI de l'LPL de TAB de macaco de Java són degudes, en part, a la glicosilació de la proteïna. En efecte, la deglicosilació de la proteïna redueix el nombre d'isoformes detectades per western blot, però encara són presents fins a 4 isoformes. És per això que les isoformes de pI, com en el cas de les de rata, han de ser degudes a altres modificacions. Contràriament, la fosforilació de la proteïna no és un dels processos implicats en la generació de les isoformes.

- Hem seqüenciat, per primera vegada, l'LPL de TAB de macaco fins a una cobertura dels 72%. La deglicosilació de la proteïna prèviament a la seqüenciació ha millorat significativament la cobertura de la proteïna obtinguda. Gràcies a l'alta homologia entre les LPL de macaco i d'humans, és possible aplicar característiques de la proteïna de l'LPL de macaco a l'LPL humana.

- Per poder desvelar els altres factors que contribueixin a la diversitat de les isoformes de l'LPL, vam intentar la posada al punt de l'isoelectroenfocament en líquid. Per problemes metodològics, no ens ha estat possible obtenir cada isoforma per separat.

IV. DISCUSSIÓ GENERAL



La lipoproteïna lipasa (**LPL**) és un enzim que juga un paper central en el metabolisme lipídic. La seva funció principal és hidrolitzar els triacilglicerols (TAG) circulants en quilomicrons (QM) i lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL). L'LPL és present a la llum endotelial de la majoria de teixits extrahepàtics, especialment en teixit adipós blanc i marró -TAB i TAM-, glàndula mamària alletant, múscul i cor. Com a resultat de la seva acció, les cèl·lules properes disposen d'àcids grassos no esterificats (NEFA) per al seu ús com a substrat energètic o estructural. Per aquest motiu, l'acció de l'LPL està molt ben regulada i de forma diferencial per a cada teixit segons els seus requeriments fisiològics.

La caracterització molecular de l'LPL ha estat poc estudiada a partir de la pròpia proteïna. Així, la majoria d'informació de què es disposa (dominis funcionals de la proteïna i característiques moleculars) s'ha estudiat a partir de l'ADNc i de la seva homologia amb la lipasa pancreàtica (Holmes et al., 2011; van Tilbeurgh et al., 1994). Tot i que experimentalment s'han determinat diversos valors del punt isoelèctric (pI) de l'LPL (Augustin et al., 1978; Sato et al., 1997; Soteriou and Cryer, 1993), en el nostre grup de recerca, vam descobrir la presència d'isoformes de pI de l'LPL en cor i plasma postheparínic de rata (Casanovas et al., 2009a) i en plasma postheparínic d'humans (Badia-Villanueva et al., 2014). En aquests treballs, es demostra la presència d'un mínim de 8 isoformes de pI de l'LPL.

En aquest nou context ens vam replantejar l'estudi de diverses característiques moleculars i funcionals de les isoformes de l'LPL.

Primer de tot, hem descrit les isoformes de pI de l'LPL en el cor de rata d'un sol individu. Per aquest resultat, podem assegurar que les isoformes no són variants al·lèliques de la mateixa proteïna. Un dels principals aspectes que hem descrit ha estat la presència i la **distribució de les isoformes de pI de l'LPL**. Inicialment hem treballat amb teixits de rata adulta: cor, TAB, TAM i múscul. Els resultats han demostrat que tots els teixits de rata dels quals s'ha pogut purificar parcialment l'LPL (Figura 15) presenten isoformes de pI de l'LPL.

També hem treballat en una de les poques situacions en què el fetge expressa LPL: en cries de rata. Aquesta circumstància d'estudi és rellevant perquè aquest teixit inicialment fa funció de TAB, però perd aquesta funció -i deixa d'expressar LPL- en els primers dies de vida dels animals fins a reduir a zero l'expressió del gen de l'LPL en l'etapa adulta (després del deslletament). Tot i haver pogut purificar l'LPL del fetge de cria de rata, ha estat metodològicament impossible aconseguir estudiar el patró d'isoformes de pI de l'LPL d'aquest teixit. Hem treballat amb diversos models d'immunoprecipitació de l'LPL a fi d'aplicar una segona purificació a l'LPL del fetge de cria de rata. Lamentablement, l'LPL ha resultat ser una proteïna difícilment purificable per IP, amb resultats incoherents.

A les cries de 15 dies de vida, però, hem pogut descriure clarament la presència d'isoformes de l'LPL al cor i al TAM.

A partir de tota la informació obtinguda de la descripció d'isoformes en teixits de rata, hem dissenyat un mètode per modelitzar el **patró d'isoformes** de cada teixit,

determinat pel nombre d'isoformes, i el pl i l'abundància relativa de cada isoforma. Aquesta modelització ens ha permès comparar els patrons obtinguts en cada purificació i determinar la similitud dels patrons d'isoformes entre diferents teixits i diferents espècies.

Hem descrit que els teixits de rata adulta presenten dos models de patró d'isoformes d'LPL: un grup està format pel TAB, TAM i múscul, els quals presenten les mateixes isoformes (en pl) però en diferent percentatge d'abundància relativa; altrament, el cor presenta un patró diferent del dels altres teixits. També hem descrit que durant el desenvolupament dels animals ja als 15 dies de vida, tant el cor com el TAM presenten patrons d'isoformes i que aquests patrons són molt similars als corresponents de l'edat adulta.

La presència de diferències entre els patrons d'isoformes de pl de l'LPL destaca la importància de la regulació diferencial d'aquest enzim. Les diferències en la funció de l'LPL i la seva activitat entre teixits és un fet àmpliament descrit (Mead et al., 2002). Tanmateix, aquests resultats mostren per primera vegada aquesta diferència a nivell de regulació posttraduccional. En aquest sentit, prenen força els resultats de treballs en què es limita l'expressió de l'LPL en certs teixits i s'estudia la capacitat de mantenir l'homeòstasi (Levak-Frank et al., 1999; Levak-Frank et al., 1997; Weinstock et al., 1997).

No s'ha trobat cap altre estudi amb un plantejament experimental com el nostre: descripció de diferents patrons d'isoformes segons teixit. La manca d'estudis similars, ja siguin de les isoformes de l'LPL o d'altres proteïnes, no dona referències d'exemples similars. A més, tampoc podem atribuir quines són les diferències de cada teixit que porten a generar diferents patrons d'isoformes, tant per pl com per abundància de cadascuna de les isoformes.

La presència de les isoformes en si ja és un fet molt important pel coneixement de l'LPL. Però el fet d'haver descrit diferències entre els patrons d'isoformes entre els teixits de rata, va posar de manifest la rellevància de la funció diferencial de l'LPL en cada teixit. A partir d'aquesta idea hem estudiat la **funció de les isoformes de pl de l'LPL**. Com està àmpliament descrit (Mead et al., 2002), l'expressió i l'activitat de l'LPL és dependent de cada teixit i de la situació fisiològica en què es trobi l'animal.

Hem descrit els **patrons** de l'LPL de diferents teixits de rata (cor, TAB i TAM) en situacions fisiològiques en les quals és sabut que l'activitat LPL varia notablement (fred, dejuni i realimentació) respecte a la situació control. De nou, mitjançant la comparació dels patrons obtinguts per a cada teixit i situació fisiològica, hem pogut determinar que existeix una variació del patró d'isoformes a les diferents condicions fisiològiques. A més, podem suggerir que aquestes modificacions dels patrons han de ser degudes a modificacions posttraduccional (PTM), ja que en algun cas, els temps d'exposició a la nova condició fisiològica (especialment la realimentació, de 2 hores) no és prou llarg com per modificar els patrons de transcripció del gen.

Existeixen un gran nombre d'estudis en què es descriuen els efectes de les PTM en la regulació de l'activitat de proteïnes (Arnaudo and Garcia, 2013; Malaney

et al., 2017). En aquest sentit, podem destacar els resultats que hem obtingut en TAB de rata. Aquest teixit manté les mateixes isoformes de pl de l'LPL en les diferents situacions fisiològiques, però en varien els percentatges de distribució. Per altra banda, un sistema de regulació ràpida de l'activitat LPL en TAB mitjançant algun tipus de PTM no descrita de la proteïna, ja havia estat estudiat per diversos autors (Bergo et al., 1996a, b; Bergo et al., 2002; Wu et al., 2004; Wu et al., 2003). Així, els nostres resultats confirmen que l'activitat LPL del TAB es regula a curt termini, en part, per modificació del pl de les isoformes, mitjançant alguna PTM encara no coneguda. Part d'aquesta regulació també es pot atribuir a la interacció de l'LPL amb altres proteïnes, ja que cada vegada es descriuen més proteïnes implicades en la regulació enzimàtica de l'LPL (Dallinga-Thie et al., 2010; Kroupa et al., 2012; Olivecrona, 2016).

També és interessant que la resposta adaptativa del patró de cada teixit a una mateixa tendència (augment o disminució de l'activitat LPL) no sempre ha resultat ser igual. És a dir, el fred causa un augment de l'activitat LPL en cor i TAM. Però mentre que en el cor manté els pl de les isoformes, en el TAM perden totalment la distribució respecte del control. Per tant, no podem relacionar unes determinades isoformes amb una major o menor activitat LPL en un determinat teixit. Novament, no s'ha trobat altra bibliografia que descriu la variació de patrons d'isoformes de pl d'altres proteïnes en diferents situacions fisiològiques per tal de poder comparar el cas de l'LPL amb altres proteïnes.

Mitjançant el pl i l'abundància relativa de les isoformes de tots els teixits de rata, hem dissenyat un sistema estadístic de classificació de les isoformes en **poblacions** segons clústers. Aquesta caracterització de les isoformes en clústers permet descriure les variacions que hi ha entre diferents situacions o teixits des d'un enfocament totalment diferent al tractat fins aleshores. Malgrat ser un estudi exploratori, hem pogut diferenciar 3 poblacions d'isoformes (clústers àcid, neutre i bàsic), les quals varien segons la situació fisiològica en què es trobi l'animal o el teixit analitzat. Així es dona més pes a la conclusió obtinguda en la comparació dels patrons dels teixits en diferents situacions fisiològiques.

Paral·lelament, hem estudiat l'afinitat de les isoformes de pl de l'LPL tant per l'ancoratge (heparina) com pel substrat. Entre les diferents isoformes no hem descrit diferències d'afinitat per heparina ja que totes les isoformes elueixen a partir d'una mateixa força iònica. Pel que fa a l'afinitat pel substrat, és interessant que totes les isoformes de pl presenten activitat LPL. Tot i això, no podem descartar petites diferències d'afinitat pel substrat, únicament detectables mitjançant assajos de cinètica enzimàtica (independentment per a cada isoforma).

Un altre punt d'estudi que ens hem plantejat ha estat determinar quines són les característiques que determinen l'**origen les isoformes de pl de l'LPL**. L'LPL depèn de la traducció d'un sol gen, del qual no s'han descrit processos de maduració alternativa. Per tant, pel que sabem, l'origen de les isoformes ha de ser posttraduccional. Així mateix s'ha descrit que l'LPL es regula per modificacions posttraduccional (Doolittle et al., 1990; Giralt et al., 1990). Conseqüentment, és possible que alguns dels mecanismes de regulació de l'LPL siguin els responsables

de la generació de les isoformes de pl. A més, ja disposem d'evidències experimentals en rata que l'LPL deu part de les seves isoformes a la glicosilació de la proteïna, però no a fosforilacions (Casanovas et al., 2009a) i que la seqüència de l'LPL presenta nitrotirosines en casos de tractament dels animals amb LPS (Casanovas et al., 2009b).

Nosaltres ens hem proposat aprofundir una mica més en el coneixement de l'origen molecular de les isoformes de pl de l'LPL. Per a això, vam fer servir mostres de macaco (*Macaca fascicularis*). Aquest tipus de mostra ens oferia no només la possibilitat de descriure per primera vegada valors d'activitat LPL en teixit d'aquesta espècie, sinó també l'estudi de l'estructura primària de l'LPL en aquesta espècie, més propera als humans, i la possible presència d'isoformes.

D'entrada, hem estudiat i s'ha descrit per primera vegada l'activitat LPL en teixits de macaco (cor, diversos TAB, TAM, múscul i fetge). Els valors obtinguts d'activitat LPL en cada un d'aquests teixit han estat valors propers als descrits en rata. A partir d'aquests resultats hem decidit purificar l'LPL del TAB visceral, el qual presenta elevada activitat LPL i és un teixit molt abundant. D'aquest teixit també n'hem descrit la presència d'isoformes de pl de l'LPL i el seu patró de distribució. El patró d'isoformes del TAB visceral de macaco presenta una distribució força diferent als patrons dels teixits de rata. En el treball de M. Badia-Villanueva (2014), es va obtenir el patró d'isoformes de pl de l'LPL del plasma postheparínic humà. Aquest patró presenta grans similituds amb el resultat obtingut en l'LPL de macaco, tant per l'interval de distribució com per l'abundància majoritària en isoformes de pl bàsic.

Totes les isoformes de pl del TAB d'aquesta espècie també presenten afinitat pel substrat i, per tant, activitat LPL. A més, com en rata (Casanovas et al., 2009a), la N-glicosilació també contribueix a l'heterogeneïtat de pl de les isoformes de l'LPL de macaco.

A partir de la purificació del TAB de macaco, hem determinat *de novo* part de l'estructura primària de l'LPL d'aquesta espècie, no a partir del seu ADNc. La cobertura assolida mitjançant diferents tractament de la mostra ha estat d'un 72% de la seqüència. En aquesta cobertura, hem pogut confirmar la presència de l'asparagina 44 i les tirosines 95 i 165. Aquests aminoàcids estan descrits en altres espècies com a objectius de modificacions posttraduccionals (PTM) (Casanovas et al., 2009b; Kobayashi et al., 1994). Gràcies a l'elevada homologia entre les seqüències entre humans i macaco (Holmes et al., 2011), les característiques de l'LPL humana es poden deduir a partir dels resultats aquí obtinguts.

Segurament per la baixa freqüència de modificacions posttraduccionals en el conjunt d'isoformes de l'LPL, ens ha estat impossible determinar aquestes modificacions posttraduccionals en la seqüenciació d'aminoàcids.

A continuació, hem treballat per separar les isoformes de pl, les unes de les altres, mitjançant l'isoelectroenfocament en líquid (*off-gel electrophoresis*; OGE). L'objectiu d'aquest treball ha estat poder treballar amb les isoformes per separat i determinar quina combinació de modificacions posttraduccionals és la responsable de cada isoforma. Novament, probablement a causa de les característiques de l'LPL, ens ha resultat impossible obtenir la purificació de cada

isoforma. Actualment, l'OGE és una tècnica en desenvolupament i encara requereix l'adaptació del protocol a algunes condicions d'algunes mostres.

A partir dels resultats obtinguts, s'obren tot un seguit de **nous plantejaments experimentals**. Aquestes hipòtesis es poden agrupar en dues línies d'investigació principals:

A) Millora del percentatge de seqüenciació i aïllament de les isoformes.

A.1) En fer ús de diferents combinacions de proteases i la deglicosilació de la mostra, s'obtenen diferents dimensions de pèptids, determinada per la relació massa i càrrega (m/z) de cada pèptid. Aquesta relació és vital per a poder-los seqüenciar per espectrometria de masses. Per tant, la combinació de diferents enzims de restricció augmentarà el percentatge de cobertura de la seqüenciació.

També, programes d'anàlisi de dades permeten combinar variacions en la seqüenciació d'aminoàcids i modificacions posttraduccionals de la seqüència teòrica per obtenir més coincidències entre els pèptids obtinguts.

A.2) Existeixen mètodes de fragmentació de pèptids en l'espectrometria de masses menys agressius per a les modificacions posttraduccionals. Així, augmentem la possibilitat de detecció d'aquestes modificacions. Un exemple és la dissociació dels pèptids per transferència d'electrons (ETD) enlloc de la dissociació per col·lisió.

B) Interacció de les isoformes amb altres proteïnes.

En el procés de regulació de l'LPL hi intervenen diversos actors: Sel1L, GPIHBP1, etc. Mitjançant col·localitzacions i immunoprecipitació de proteïnes es pot descriure la interacció de les isoformes amb aquestes proteïnes. Sobretot val la pena destacar l'efecte que poden tenir la GPIHBP1 i l'ANGPTL4, ja que totes dues proteïnes estan relacionades amb el balanç d'activitat LPL de cada teixit.

Per exemplificar-ho, està descrit que en dejuni, l'expressió de d'ANGPTL4 augmenta en TAB (Mandard et al., 2006; Sukonina et al., 2006). Aquest fet afavoreix la reducció de l'activitat LPL. En el cas del dejuni, hem descrit l'augment relatiu d'isoformes de pl més bàsics. És possible que aquestes isoformes siguin menys sensibles a l'ANGPTL4? Presenten major afinitat per la GPIHBP1 i per això no són inactivades?

V. CONCLUSIONS



1) Les isoformes de pl de l'LPL són presents en el cor d'un sol individu. En la purificació parcial de l'LPL d'un únic cor de rata ja apareixen fins a 9 isoformes de pl de l'LPL. Per tant, les isoformes són totes degudes a modificacions posttraduccionals de la proteïna.

2) L'LPL presenta isoformes de pl en cor, TAB, TAM i múscul de rata adulta. El cor presenta un patró d'isoformes diferent al dels altres teixits estudiats (teixit adipós blanc, teixit adipós marró i múscul esquelètic) pel que fa al pl i a l'abundància relativa de les isoformes.

3) En teixits de cries de rata, l'LPL també presenta isoformes de pl. Com en l'adult, hi ha diferències entre els patrons de cor i teixit adipós marró. En el cas del fetge, també hem detectat isoformes de pl de l'LPL, a diferència del fetge adult.

4) El macaco de Java (*Macaca fascicularis*) presenta isoformes de pl de l'LPL en el teixit adipós blanc. En la purificació parcial de l'LPL de TAB visceral de macaco apareixen fins a 8 isoformes de pl de l'LPL.

5) Totes les isoformes de pl de l'LPL de TAB de macaco i TAB de rata presenten activitat LPL. Per tant, sembla que les isoformes de l'LPL no constitueixen un mecanisme per mantenir una reserva d'isoformes inactives.

6) Totes les isoformes de pl de l'LPL de TAB de macaco presenten la mateixa afinitat per l'heparina. Per tant, sembla que la unió a l'ancoratge endotelial no és una característica diferencial entre isoformes, que pugui modular la seva funcionalitat.

7) El patró d'isoformes de pl de l'LPL varia en diferents condicions fisiològiques en les que varia l'activitat LPL total. El cas més destacat és el del teixit adipós blanc, el qual perd part de les isoformes àcides en favor de les isoformes més bàsiques en situacions de pèrdua d'activitat LPL (fred i dejuni). El cor també modifica l'abundància relativa del patró de distribució, tot i que únicament en el cas del fred. Finalment, el teixit adipós marró també presenta diferències en els patrons a nivell de pl entre diferents condicions fisiològiques. Aquestes variacions indiquen una possible relació entre els canvis en el patró d'isoformes i la regulació fisiològica de l'activitat LPL.

8) Les isoformes de pl de l'LPL en rata es poden diferenciar en tres poblacions (o clústers): àcida, bàsica i neutra. Hem presentat un mètode estadístic per classificar les isoformes en poblacions segons el pl i l'abundància relativa. Aquestes poblacions varien segons la condició fisiològica en què es trobi l'animal o el teixit analitzat (muscular contra teixit adipós).

9) La N-glicosilació contribueix a l'heterogeneïtat de pI de l'LPL de macaco. La deglicosilació de la proteïna redueix, en part, el número d'isoformes. Com en la rata, aquesta diversitat d'isoformes no és deguda a canvis en el grau de fosforilació. Per tant, en la diversitat de les isoformes de pI de l'LPL han d'estar implicades altres modificacions posttraduccionals.

10) Hem assolit la seqüenciació *de novo* d'un 72% de la proteïna LPL de TAB de macaco. Per primera vegada disposem de la informació directa de la seqüència de l'LPL d'aquesta espècie. A més, es poden aplicar característiques de l'LPL de macaco a l'LPL humana, gràcies a l'alta homologia entre les dues espècies.

VI. MATERIALS I MÈTODES



El Grup de Recerca Metabolisme Lipídic - LPL (Grup LPL) de la Universitat de Barcelona, on es va desenvolupar la majoria de metodologies, disposa des de l'any 2011 d'un sistema de gestió de la qualitat segons la normativa **ISO9001:2008** certificat per AP-plus⁺ i més recentment per SGS. Per això, els procediments de treball més habituals del grup de recerca tenen associats procediments normalitzats de treball (PNT), a fi de treballar de forma més homogènia tots els integrants del grup d'investigació i d'estandarditzar els resultats.

També el grup IIBB - Laboratorio Proteómica CSIC/UAB de Universitat Autònoma de Barcelona disposa de certificació pel sistema de gestió de la qualitat segons la normativa **ISO9001:2008** certificat per AP-plus⁺.

Durant l'apartat de metodologies, es destaca quines segueixen les instruccions d'un PNT a través de la seva referència al costat del títol. Aquests procediments estandarditzats es poden consultar al grup d'investigació (Grup LPL) i a l'Agència de Polítiques i Qualitat de la UB.

1. Purificació parcial de l'LPL per a l'estudi de les isoformes

1.1. Cromatografia d'afinitat en columnes d'heparina-Sepharose

1.1.1. Fonament del mètode

Els heparan sulfats (HSPG) que envolten la llum endotelial dels capil·lars sanguinis retenen els dímers de l'LPL per forces electrostàtiques entre les càrregues negatives dels proteoglicans i les càrregues positives de l'LPL (Lookene et al., 1996). L'heparina és un glicosaminoglicà amb un gran nombre de càrregues negatives. És per aquesta característica que l'heparina presenta una alta afinitat per l'LPL. A més, l'heparina té la capacitat d'estabilitzar l'activitat enzimàtica de l'LPL (Lutz et al., 2001). L'ús d'heparina immobilitzada en una fase sòlida (*Sepharose*) ha estat la metodologia més utilitzada per a la purificació parcial de l'LPL mitjançant cromatografia d'afinitat; posteriorment, la interacció entre l'heparina i l'LPL es pot trencar mitjançant una solució d'elevada força iònica (habitualment, superior a 1M NaCl).

1.1.2. Reactius

- Heparina-Sepharose CL-6B (ref. 17-0467-01; GE Healthcare)
- NaCl
- Tampó d'empaquetament pH 7,4
 - Tris HCl 10 mM
- Tampó de conservació pH 7,4
 - Tris HCl 10 mM
 - Etanol 20% (v/v)
- Tampó d'homogeneïtzació pH 7,5
 - HEPES 10 mM
 - EDTA 1 mM
 - DTT 1 mM
 - Desoxicolat sòdic 0,3% (p/v) (ref. D6750; Sigma-Aldrich)
- Tampó d'equilibrat pH 7,4
 - Tris HCl 10 mM
 - Glicerol 30% (v/v)
 - NaCl 0,15 M
- Tampó de rentat pH 7,4
 - Tris HCl 10 mM
 - Glicerol 30% (v/v)
 - NaCl 0,75 M
- Tampó d'elució pH 7,4
 - Tris HCl 10 mM
 - Glicerol 30% (v/v)
 - NaCl 1,5 M
- Tampó de regeneració A, pH 8,5
 - Tris HCl 100 mM

- NaCl 0,5 M
- Tampó de regeneració B, pH 5
 - Acetat sòdic 100 mM
 - NaCl 0,5 M
- Tampó de conservació
 - Tris HCl 10 mM
 - Etanol 20% (v/v)
- Albúmina sèrica bovina sense àcids grassos lliures (BSA FFA) (50mg/mL)
- Aigua destil·lada ultrapura (ADMQ) (Millipore)

1.1.3. Aparells

- Columnes de vidre (ref. 737-0732; BIO-RAD)
- Homogeneïtzador (Ultra-Turrax T25, IKA-Labortechnik)
- Col·lector de fraccions (LKB Redi-Frac; Pharmacia)

1.1.4. Procediment

A) Rehidratació i empaquetament de l'heparina-Sepharose

Primer de tot, es va pesar la quantitat d'heparina-Sepharose que fos necessària per a cada columna, que podien ser de 5 o 10 mL totals. Per això, es va tenir en compte que cada gram inicial d'heparina-Sepharose equival a 4 mL de volum final. Es va pesar fins a 1,4 g d'heparina-Sepharose en un tub Falcon de plàstic de 50 mL net (netejat amb etanol absolut i assecat).

A partir d'aquest moment, tots els reactius líquids i l'heparina es van mantenir a 4°C o mantinguts en gel sempre que va ser possible.

Un cop l'heparina va estar pesada (en el tub A), s'hi va afegir aigua destil·lada ultrapura (ADMQ) fins a 50 mL, es va deixar en agitació orbital durant 15 minuts, es va centrifugar (5 minuts a 750 x g) i es va passar el sobrenedant, amb molta cura per no endur-se heparina-Sepharose, a un nou tub (B) de 50 mL net. Aquest segon tub va servir per a recol·lectar l'heparina-Sepharose que s'arrossegues del tub A. En aquest moment, els tubs es van reomplir amb ADMQ i es va repetir el procés d'incubar 15 minuts a 4°C en agitació orbital, centrifugar (5 minuts a 750 x g) els tubs, descartar el sobrenedant del tub B i passar el sobrenedant del tub A al tub B; tot això fins a 6 rentats amb ADMQ del tub A.

Una vegada fet i centrifugat el sisè rentat, els sobrenedants es van descartar i tota l'heparina-Sepharose rehidratada es va ajuntar en un sol tub. Aleshores, es van fer 3 rentats més de l'heparina, però amb tampó d'empaquetament i es va descartar el sobrenedant. Després de centrifugar el darrer rentat, es va descartar el tampó d'empaquetament fins a deixar 1:1 (v:v) respecte l'heparina. Un cop l'heparina-Sepharose ja estava rehidratada i rentada, es va guardar a 4°C fins al següent pas: l'empaquetament.

En el moment en què es va decidir empaquetar l'heparina-Sepharose en la columna de vidre, primer de tot es va retirar el tampó d'empaquetament fins a deixar mig centímetre, aproximadament, per sobre de l'heparina-Sepharose. Tot seguit, es va mantenir l'heparina durant 30 minuts en el buit per eliminar-ne l'aire.

Ja a la cambra freda (4°C), l'heparina-*Sepharose* va ser introduïda a la columna i es va empaquetar fent passar tampó d'empaquetament a 30 mL/h, mitjançant una bomba peristàltica, durant 9 volums de columna. Una vegada la columna va estar empaquetada, es va mantenir en tampó de conservació o directament es va fer servir per a la purificació parcial de l'LPL.

B) Homogeneïtzació dels teixits

Durant tot el procés de preparació de la mostra per a purificar-ne parcialment l'LPL, es va mantenir la mostra en fred (4°C), a fi d'evitar la inactivació de l'LPL en la mesura possible. Per això, els recipients on hi havia mostra, es van manipular inclosos en llits de gel o es van mantenir dins de la nevera durant les incubacions.

Es van pesar entre 3 i 4 g de teixit a cada tub Falcon de plàstic de 50 mL de volum. En el cas dels teixits més grossos que aquest pes, van ser fragmentats en trossos més petits en un morter, sempre mantinguts congelats amb nitrogen líquid. Un cop tota la mostra va estar repartida entre els diferents tubs Falcon, a cada tub s'hi va afegir un volum de tampó d'homogeneïtzació igual a 5 vegades el pes del teixit. A l'hora d'homogeneïtzar els teixits, es va fer servir un homogeneïtzador a màxima potència, en intervals de 10 segons i 10 més de pausa a fi d'evitar que el teixit s'escalfés, fins que la mostra va quedar totalment homogeneïtzada.

Immediatament, la mostra es va deixar una hora en nevera per deixar actuar el desoxicolat sòdic, el qual ajuda a solubilitzar components cel·lulars i a la dissociació de proteïnes associades a membranes. A continuació, es va centrifugar (5 minuts a 750 x g) la mostra, per eliminar la majoria de greix. Seguidament, la mostra es va tornar a centrifugar en una o dues centrifugadores, en funció del tipus de teixit:

- Els teixits més greixosos –tots els teixits adiposos blancs- van començar sent centrifugats a 10.000 x g durant 30 minuts. L'objectiu va ser eliminar en gran mesura els lípids de la mostra.
- Tots els teixits, sense importar si ja havien estat centrifugats o no, es van centrifugar a 50.000 x g durant 90 minuts.

Després de la centrifugació, es va descartar la capa superior de lípids mitjançant una pipeta Pasteur de vidre connectada a una bomba de buit. Es va guardar el sobrenedant a -80°C fins al moment del seu ús.

C) Purificació parcial de l'LPL

Tots els passos es van fer en fred (4°C, ja fos en cambra freda o mostres mantingudes en gel) per evitar la pèrdua d'activitat de l'LPL. Les mostres es van guardar al més aviat possible al congelador (-80°C) pel mateix motiu.

En aquesta metodologia, el volum sortint de la cromatografia es va recollir en fraccions d'1,7 mL en tubs eppendorf de plàstic nets, fent ús d'un col·lector automàtic de fraccions (Figura 98). Durant els diferents canvis de tampó, va ser

molt important que no s'assequés l'heparina-*Sepharose* i, per tant, sempre mantenir-la amb tampó.

El primer pas va ser equilibrar les columnes amb el tampó d'equilibrat. Per això, mitjançant una bomba peristàtica, es va passar fins a 7 volums de columna a un flux de 15 mL/h. A partir d'aquest moment, el flux de treball es va mantenir a 15 mL/h.

Mentrestant, es va descongelar la mostra i s'hi va afegir NaCl fins a una concentració de 0,15 M. Tot seguit, es va començar la purificació parcial de l'LPL fent passar la mostra per l'heparina-*Sepharose*. Una vegada la mostra ja va haver passat tota, es va fer passar el tampó de rentat, durant un volum de 7 columnes. Aquestes fraccions del pas del tampó de rentat, contenen les proteïnes amb baixa afinitat per l'heparina. El tampó d'elució que es va passar a continuació, tampó d'alta força iònica, va ser per eluir les proteïnes amb alta afinitat per l'heparina, principalment, l'LPL. D'aquest tampó també es van passar 7 volums de columna.

Una vegada l'LPL ja s'havia eluït de la columna, el següent pas va ser la regeneració: 3 rondes de tampó de regeneració A i tampó de regeneració B, en aquest ordre; i 2 volums de columna de cada tampó. Finalment, es va passar tampó de conservació (3 volums de columna).

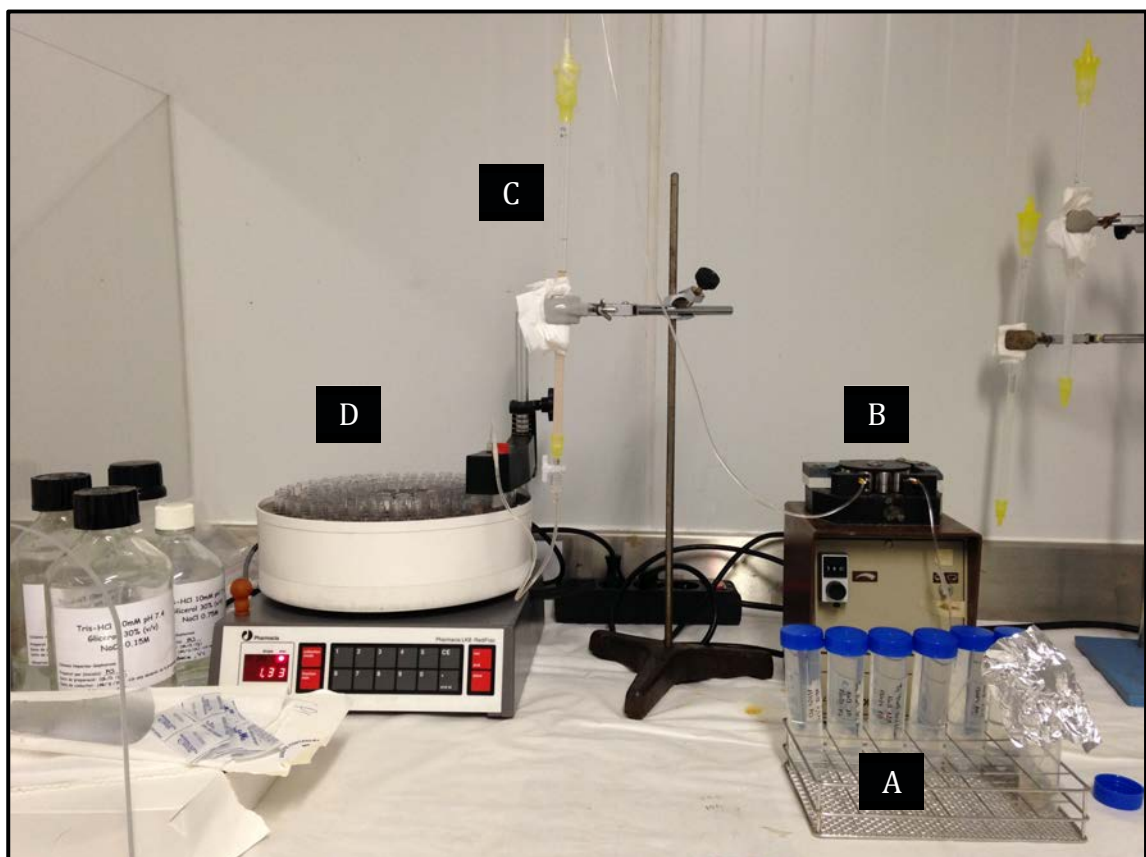


Figura 98. Sistema de purificació parcial de l'LPL. A) Tampons; B) Bomba peristàtica; C) Columna amb l'heparina-*Sepharose*; D) Col·lector de fraccions.

Durant tots el procés de recollida de fraccions (des del pas de la mostra fins a l'elució de l'LPL) es van prendre mostres d'algunes fraccions per descriure el funcionament de la purificació. De cada fracció escollida, es va prendre una alíquota de 25 µL per quantificar-ne la proteïna total i una altra de 50 µL per valorar-ne l'activitat LPL (en aquesta, a més, s'hi va afegir BSA immediatament fins a una concentració final d'1 mg/mL; la BSA afavoreix a l'estabilitat de l'LPL en el procés de congelació i descongelació).

Alternativament a l'elució explicada anteriorment, es van aplicar altres procediments per eluir l'LPL de manera diferencial de l'heparina. En un primer abordament, es va treballar amb un conjunt de tampons d'elució de creixent força iònica: des de 0,9 M fins a 1,5 M en intervals de 0,1 M de NaCl (6 volums de columna per a cada tampó). El segon procediment, va deixar eluint a 1M durant un llarg període de temps (18 volums de columna). De la mateixa manera que s'ha explicat anteriorment, en tots dos casos es va prendre mostres de les fraccions amb l'objectiu de quantificar-ne la proteïna total i l'activitat lipasa.

1.2. Determinació de la proteïna total (PNT 0350600 EXP/016)

1.2.1. Fonament del mètode

Aquesta metodologia colorimètrica està basada en el mètode de Bradford, en el qual es reconeix el reactiu de Coomassie, unit a les càrregues positives de les proteïnes (aminoàcids bàsics o aromàtics). El colorant unit a les proteïnes té un pic d'absorbància a la longitud d'ona de 595 nm.

1.2.2. Reactius

- Coomassie protein assay (ref. 1856209; ThermoFisher)
- BSA Standard (ref. 23209; ThermoFisher)
- Aigua destil·lada ultrapura (ADMQ) (Millipore)

1.2.3. Aparells

- Lector de microplaques (Sunrise, Tecan)

1.2.4. Procediment

A partir de l'estàndard de BSA, es van crear 6 punts de recta patró (entre 1mg/mL i 0 mg/mL) en el mateix diluent de la mostra. A la placa de 96 pouets, es va carregar per triplicat els punts de la patró de BSA i per duplicat les mostres ja diluïdes (dilució 1/3 v/v en ADMQ). Tot seguit, es van afegir 300 µL de reactiu de Coomassie. La mostra es va incubar durant 15 minuts en agitació suau (*"wide"*) en el rector de microplaques i, passat aquest temps, es va fer la lectura de l'absorbància a 595 nm.

A partir dels valors de la recta patró, es van calcular les concentracions de proteïna total.

1.3. Valoració de l'activitat lipoproteïna lipasa (PNT 0350600 EXP/013)

1.3.1. Fonament del mètode

És una metodologia posada al punt en el nostre grup, que es basa en la modificació de Julve et al. (1996) sobre el procediment posat al punt prèviament per Ramirez et al. (1985).

En aquest assaig, l'activitat lipasa de l'LPL es mesura indirectament mitjançant la quantificació del producte de la reacció enzimàtica: àcids grassos lliures (NEFA). La mostra -on hi ha l'LPL- es dilueix en la solució substrat -on hi ha TAG marcats amb triti- sobre la qual actuarà l'enzim. Tot seguit s'atura la reacció i se separen els NEFA dels TAG no hidrolitzats. La quantitat de producte generat es mesura en un comptador beta, gràcies a l'emissió de llum per part del líquid d'escintil·lació, proporcional al triti present en els NEFA generats per l'activitat lipasa de l'LPL.

1.3.2. Reactius

- Tampó EDH pH 7,5
 - EDTA 1mM
 - DTT 1mM
 - HEPES 10mM
 - Heparina 5 UI/mL (USB)
- Sèrum R21 anti-HL
- Substrat TO* en toluè
 - Trioleïna freda 36,7 mM
 - Trioleïna radioactiva (5 mCi/mL) 0,075 µL/mL (NET431005MC; PerkinElmer)
- Tampó LPL pH 7,5
 - PIPES 28,88mM
 - MgCl₂ x 6H₂O 57,76 mM
 - BSA FFA 8,76 µM
- Sèrum de rata preescalfat a 55°C
- Solució d'aturada
 - Metanol:cloroform:heptà (1,41:1,25:1) (v/v/v)
- Tampó borat-carbonat pH 10
 - H₃BO₃ 100mM
 - K₂CO₃ 100mM
 S'ajusta el pH del H₃BO₃ amb la solució K₂CO₃
- Líquid d'escintil·lació (EcoScint; National Diagnostics)

1.3.3. Aparells

- Homogeneïtzador (Ultra-Turrax T25, IKA-Labortechnik)
- Sonicador (VibraCell, Sonics&Materials, Inc.)

- Comptador beta (Fotomultiplicador Beta, *Liquid Scintillation Analyzer Tri-carb* 1500, Packard)

1.3.4. Procediment

A) Homogeneïtzació i preparació de les mostres

En tots els moments en què es va manipular mostra, es va mantenir en gel per no perdre activitat lipasa.

La preparació de les mostres es va diferenciar segons el seu origen:

- En teixits, el primer pas va ser l'homogeneïtzació de les mostres en tampó EDH, en una dilució 1/6 (p/v). Per fer-ho, trossos de teixits (250-500 mg) van ser inclosos en tubs de plàstic i se'ls va afegir la part proporcional de tampó EDH. A l'hora d'homogeneïtzar els teixits, es va fer servir un homogeneïtzador a màxima potència, en intervals de 5 segons i 5 més de pausa a fi d'evitar que el teixit s'escalfés, fins que la mostra va quedar totalment homogeneïtzada. Les mostres van ser centrifugades durant 15 minuts a 16.100 x g i, després d'eliminar la galeta de greix, es va diluir el sobrenedant 1/4 (v/v) en tampó EDH. D'aquesta dilució, 7 µL es van carregar a un tub Corning de vidre (13 x 100 mm).
- En mostres provinents de fraccions de columna d'heparina-*Sepharose*, no va ser necessari diluir-les en EDH, sinó que 7 µL van ser carregats en un tub de vidre.
- Les mostres d'homogeneïtzats de columna de purificació parcial d'LPL sí que es van diluir 1/4 (v/v) en EDH, prèviament a carregar-les en els tubs Corning.

B) Controls d'assaig

En tots els assajos, es van incloure controls: un control de blanc (amb tampó EDH com a mostra, a fi de valorar la hidròlisi no enzimàtica dels TAG) i un control de cor i fetge de rata adulta (com a controls positius de l'assaig). Tant els blancs com el cor i el fetge van ser tractats de la mateixa manera que les mostres. El control de cor es va incloure com a mostra amb un valor elevat d'activitat LPL mentre que el fetge es va incloure com a control per a l'assaig d'inactivació de la HL.

Les mostres de fetge i de plasma a més de contenir LPL, també tenen HL. Aquesta lipasa creua amb el mètode de valoració de l'LPL. Per això era necessari fer un tractament de les mostres per inhibir l'activitat lipasa de la HL però no de l'LPL. Els casos de mostres de fetge i plasma, en el moment de diluir les mostres en tampó EDH, també s'hi va afegir un volum de sèrum anti-HL (1:2:1 mostra:EDH:sèrum, en volums). Una vegada diluïdes, es van preincubar durant 2 hores a 4°C. Després, van seguir el procediment com una mostra normal.

Quan es va aplicar aquest pretractament, els controls es van duplicar i el segon joc de controls també se'l va pretractar amb aquest anti-sèrum. Així, el fetge de rata va fer de control de tractament.

Un cop totes les mostres i controls van ser carregats en tubs de vidre, ja es va poder seguir amb l'assaig de valoració de l'activitat LPL.

C) Preparació del substrat radioactiu

Els volums necessaris de cada reactiu es van calcular a partir del nombre de mostres: 1,2 µL de substrat TO*, 58 µL de tampó LPL i 2 µL de sèrum de rata preescalfat per a cada mostra/control a valorar (per duplicat).

Una vegada fets els càlculs, es va passar el substrat TO* a un tub Pyrex amb rosca i es va gasejar amb nitrogen per assecar-ne el toluè. Quan la trioleïna ja va estar seca, s'hi va afegir el volum necessari de tampó LPL i es va sonicar tres vegades, en fred, durant 30 segons amb pauses de 15 segons a una amplitud del 40%. Aleshores, el tub de Pyrex es va agitar i es va sonicar una vegada més. Després de comprovar que no hi quedaven gotes de trioleïna no sonicada a la superfície del tampó, s'hi va afegir el sèrum de rata. Aquest sèrum preescalfat es fa servir com a font d'Apo C-II, sense afegir-hi més LPL perquè s'havia inactivat.

En aquest moment, el substrat radioactiu ja va estar a punt i es va mantenir en fred (4°C) fins a fer-ne ús el mateix dia.

D) Valoració enzimàtica

La reacció de valoració es va iniciar en afegir 60 µL de substrat radioactiu a cada mostra. Immediatament es va agitar i es va deixar la mostra en un bany a 25°C durant 30 minuts.

Passat aquest temps, a cada tub s'hi va afegir 1,2 mL de solució d'aturada i 0,33 mL de tampó borat-carbonat per aturar la reacció. Una vegada es va haver aturat la reacció a tots els tubs, van ser agitats durant 6 minuts a 1.100 rpm (Orbital Vibrax, OVAN) i es van centrifugar durant 10 minuts a 450 x g en fred. Una vegada les dues fases –polar i apolar- ja van estar ben separades, 300 µL del sobrenedant, més polar, es van transvasar a un tub especial per a l'escintil·lació (ref. 00934-00; Kartell) amb 3 mL de líquid d'escintil·lació.

Aquests tubs, van ser llegits en un comptador beta segons el PNT (IT 0335500/001. Instruccions d'ús. Comptador de centelleig líquid, marca Packard model Tri-carb (2100)) del Servei de Radioisòtops de la Facultat de Biologia i el nombre de desintegracions per minut (dpm) obtingudes van ser transformades a mU/mL.

1.3.5. Càlculs

Els resultats obtinguts del comptador beta, en dpm van ser transformats en mU/mL mitjançant la fórmula següent:

$$\text{Activitat LPL } \left(\frac{\text{mU}}{\text{mL}} \right) = \frac{(\text{dpm} - \text{blanc}) * VSt * d}{VSp * Vm * t * AE}$$

on dpm és el valor de desintegracions per minuts obtingut de la mostra, $blanc$ és la mitjana de dpm obtinguda del control de blanc, VSt equival al volum de la fase superior total (0,859 mL) i d és la dilució aplicada a la mostra posterior a l'homogeneïtzat. En el divisor, VSp és el volum de la fase superior transvasat al líquid d'escintil·lació (0,3 mL), Vm és el volum de mostra carregar al tub de vidre (0,007 mL), t és el temps d'incubació de la reacció (30 minuts) i AE equival a l'activitat específica de cada estoc de substrat TO* fabricat.

Les unitats (U) es defineixen com la quantitat d'enzim que allibera 1 μmol de producte per minut a 25°C.

1.3.6. Descontaminació i gestió dels residus

Tot el tractament dels residus generats durant la valoració d'activitat LPL es va dur a terme al Servei de Radioisòtops de la Facultat de Biologia. Per fer-ho, es van seguir les instruccions que descriu el corresponent PNT (PNT 0335500 DOC/008. Tratamiento de la contaminación radioactiva y descontaminación).

2. Estudi molecular de les isoformes de l'LPL

2.1. Precipitació de les proteïnes

Per a diversos procediments d'aquesta tesi és necessari un pas previ de precipitació de proteïnes. Aquesta metodologia és àmpliament utilitzada pel seu alt rendiment de precipitació en mostres amb baixa concentració de proteïnes (Jiang et al., 2004). Els objectius de la precipitació són, principalment, tres: concentrar la mostra (indirectament, reduir el volum que la conté); canviar el tampó en què es troba la mostra; i eliminar possibles contaminants de la mostra (àcids nucleics, lípids, sals, detergents,...). Aquests contaminants poden afectar diversos punts de les metodologies en què es faran servir les mostres, des de la recuperació de les proteïnes fins al seu correcte enfocament en IEF.

2.1.1. Fonament del mètode

El procés de precipitació de proteïnes es basa a reduir la solubilitat de les mostres per l'addició d'un àcid al medi i per la temperatura de treball (4°C). En reduir la solubilitat de les proteïnes, aquestes acaben formant agregats, els quals es podran precipitar per centrifugació.

2.1.2. Reactius

- Àcid tricloroacètic (TCA) 20% (p/v) (ref. 131067; Panreac)
- Acetona (grau de puresa PA-ACS-ISO)(ref. 131007-1612; Panreac)

2.1.3. Procediment

Es va separar la mostra que es va voler precipitar en un tub eppendorf net de 2 mL. Després, en agitació suau, es va afegir TCA en aquesta mostra, de manera que la concentració final a la mostra fos del 5% (p/v) (Rajalingam et al., 2009). És molt important que el TCA s'afegeixi gota a gota i molt fred (4°C) a fi d'afavorir la precipitació de les proteïnes.

A continuació, la mostra es va deixar en un agitador orbital a 4°C durant una hora. Passat aquest temps, es va centrifugar la mostra (16.100 x g, 10 minuts a 4°C) i es va descartar el sobrenedant; després es van fer dos rentats en TCA al 5% (16.100 x g, 5 minuts a 4°C) i un darrer amb acetona per eliminar les restes de TCA (16.100 x g, 1 minut a 4°C). Les restes d'acetona es deixen evaporar a temperatura ambient. Finalment, la mostra precipitada es pot dissoldre en el tampó desitjat.

Segons el mètode que es vulgui dur a terme a continuació de la precipitació, hi ha petites adaptacions i maneres de treballar amb la mostra. Per exemple:

- Els dos rentats de TCA al 5% es poden estalviar si la sal present a la mostra no interfereix en el següent procediment. D'aquesta manera, reduïm pèrdues de mostra durant la manipulació. El cas en què no es fan aquests rentats és per a l'electroforesi en SDS-PAGE en una dimensió.
- La dissolució de la mostra en el nou tampó es pot fer de diferents maneres, ja sigui fent servir sonicador (amplitud al 30%; sonicador UPH100, Hielscher

Ultrasonics, Teltow, Alemanya) o sense sonicar; ja sigui en fred si no volem que la mostra s'escalfi o sense manipular-la en fred. En els casos en què no es fa servir el sonicador, copejar el tub contra el vòrtex i deixar temps, són factors que afavoreixen la dissolució de la proteïna.

2.2. Electroforesi en SDS-PAGE (PNT 0350600EXP/017) (1DE)

2.2.1. Fonament del mètode

Les diferents proteïnes d'una mostra es poden separar segons el seu pes molecular. Aquest procediment es basa en l'aplicació d'un camp elèctric a un conjunt de proteïnes carregades negativament pel dodecil sulfat sòdic (SDS), el qual manté una relació massa/càrrega constant a totes les proteïnes. Aquestes proteïnes avançaran a diferents velocitats per un gel de poliacrilamida (PAGE), en funció del seu pes molecular: a major pes, menor velocitat.

2.2.2. Reactius

- Tampó de mostres pH 6,8
 - Tris-HCl 62 mM
 - Glicerol 10% (v/v)
 - SDS 2% (p/v)
 - Dithiothreitol (DTT) 150 mM (ref. 17-1318-01; GE Healthcare)
 - Blau de bromofenol
- Gel d'electroforesi
 - Gel concentrador (acrilamida 4% (p/v))
 - Gel separador (acrilamida 9% (p/v))

2.2.3. Aparells

- Font d'electroforesi (Power-Pac 200; BIO-RAD)

2.2.4. Procediment

Les mostres, una vegada en el tampó de mostres, es van bullir durant 10 minuts per permetre l'efecte de l'SDS i del DTT. El DTT és un agent reductor que evita la formació, de nou, dels ponts disulfur de les proteïnes. Es van carregar als carrils del gel concentrador i es va aplicar un camp elèctric al gel fins que el front del blau de bromofenol va sortir per la part inferior del gel de poliacrilamida (Figura 99). El camp elèctric que es va aplicar va ser de 50 V els primers 30 minuts i, passat aquest temps, es va augmentar a 150 V fins al final de l'assaig.

A partir d'aquest moment, el gel amb les proteïnes separades segons el seu pes molecular, es podia destinar a múltiples finalitats: a la detecció de l'LPL mitjançant anticossos, al revelat de les proteïnes per tint amb plata, etc.

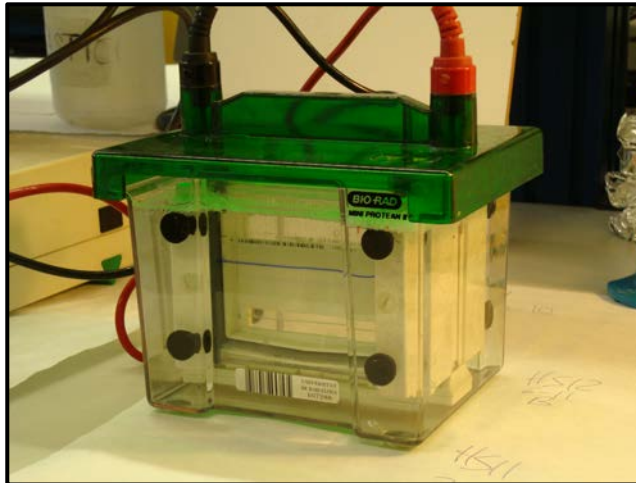


Figura 99. Electroforesi en SDS-PAGE. Mostra sota l'efecte del camp elèctric, el qual fa avançar les molècules proteiques d'acord amb el seu pes molecular. El front de color blau és el bromofenol del tampó de mostres.

2.3. Immunodetecció de l'LPL (PNT 0350600 EXP/017) (WB)

2.3.1. Fonament del mètode

La detecció de proteïnes mitjançant anticossos específics es basa en l'afinitat d'aquests anticossos per a la seva proteïna diana. Posteriorment, s'utilitza un mètode de revelat per a l'observació d'aquesta interacció. Aquests mètodes de revelat són molt variats i van des de l'ús d'anticossos secundaris específics a l'ús de biotina-streptavidina.

En el nostre cas, es va fer servir un anticòs de ratolí contra LPL, el 5D2 (Chang, 1998; Casanovas, 2008), i un anticòs secundari de cabra contra ratolí marcat amb una peroxidasa: *horseradish peroxidase* (HRP). Finalment, es detecta la presència d'aquest enzim per producció de llum i exposició i revelat d'un film fotogràfic.

2.3.2. Reactius

- Membrana de nitrocel·lulosa (ref. RPN3032D; GE Healthcare)
- Anticossos:
 - 5D2 (IgG) *mouse anti-human LPL* (cedit pel Dr. Brunzell, University of Washington, Seattle, USA)
 - *Goat anti-mouse IgG-HRP* (ref. AP181P; Chemicon)
- SuperSignal® Chemiluminiscent Substrate (ref. 34077 i 34075; ThermoFisher)
- Film fotogràfic HYPERFILM ECL (ref. 28-9068-36; GE Healthcare)

2.3.3. Aparells

- Font d'electroforesi (Power-Pac 200; BIO-RAD)
- Revelador de films fotogràfics (FMP100A; Fujifilm)

2.3.4. Procediment

Les proteïnes presents al gel provinent de l'SDS-PAGE van ser transferides a la membrana de nitrocel·lulosa durant 1 hora a 100 V. Després del bloqueig de la membrana, es va deixar la membrana en contacte amb l'anticòs primari durant tota la nit a 4°C. L'endemà, després d'haver rentat la membrana, es va incubar amb l'anticòs secundari, durant 2 hores a RT.

Finalment, després d'haver rentat la membrana de l'anticòs secundari, es va procedir amb la detecció en film fotogràfic, per l'acció de l'enzim HRP sobre del substrat quimioluminiscent.

2.4. Tint de proteïnes amb plata (PNT 0350600 EXP/021) (Ag)

2.4.1. Fonament del mètode

Aquesta tècnica de revelat de proteïnes es basa en l'afinitat de la plata (Ag^+) per les proteïnes. El principal avantatge d'aquest mètode és que permet el posterior ús de les mostres en metodologies d'identificació i seqüenciació de pèptids.

2.4.2. Reactius

- Tampó de fixació
 - Etanol 40% (v/v)
 - Àcid acètic 10% (v/v)
- Tampó de sensibilització
 - Etanol 30% (v/v)
 - Tiosulfat sòdic 0,2% (p/v)
 - Acetat sòdic 6,8% (p/v)
- Tampó de tint
 - Nitrat de plata 2,5% (p/v)
- Tampó de revelat
 - Carbonat sòdic 2,5% (p/v)
 - Formaldehid 0,0148 % (p/v)
- Tampó d'aturada
 - EDTA di-sòdic di-hidratat 1,46% (p/v)

2.4.3. Procediment

El gel provinent d'un SDS-PAGE es va fixar amb tampó de fixació durant 30 minuts i sensibilitzar amb tampó de sensibilització durant 30 minuts més. Després de tres rentats en aigua de 5 minuts, el gel es va deixar 20 minuts a les fosques en tampó de tint. De nou, el gel es va rentar dues vegades, un minut cada vegada i es va revelar. La durada d'aquest pas es decideix visualment, ja que el senyal del marcatge és cada vegada més fort, fins que augmenta també el soroll de fons. La reacció de revelat es va aturar amb el tampó amb EDTA durant 10 minuts. Després de tres rentats més de 5 minuts, el gel ja estava a punt per a escanejar-lo i poder treballar amb les mostres revelades.

2.5. Electroforesi bidimensional de l'LPL (PNT 0350600 EXP/020) (2DE)

L'estudi de l'expressió de proteïnes troba dificultats degudes a la similitud entre proteïnes presents en mostres complexes i als baixos nivells d'expressió de certes proteïnes. Tanmateix, aquests impediments han estat resolts gràcies a l'ús de l'electroforesi bidimensional prèviament a l'anàlisi proteòmica. De les mostres tractades en 2DE, se n'obtenen resultats en què les proteïnes queden distribuïdes segons el seu pI i pel seu pes molecular aparent.

2.5.1. Fonament del mètode

Les proteïnes presents a la mostra, sota l'efecte d'un cap elèctric, es desplacen en un gel de poliacrilamida (el qual incorpora un gradient de pH) fins que se situen en un punt en què la seva càrrega neta és zero. Aquesta primera fase o dimensió de l'electroforesi bidimensional, és l'isoelectroenfocament (IEF) (Figura 100). A continuació, la mostra s'analitza en un SDS-PAGE i es detecten les proteïnes per diferents metodologies.

2.5.2. Reactius

- Tampó de rehidratació amb *IPG buffer*
 - Urea 7 M
 - Tiourea 2 M (RPN6301; GE Healthcare)
 - CHAPS 2% (p/v)
 - Blau de bromofenol
 - *IPG buffer* pH 6-11 0,5% (v/v) (ref.17-6001-78; GE Healthcare)
 - Agent reductor: DTT 18 mM o *DeStreak* 1,2% (v/v) (ref. 17-6003-18; GE Healthcare). Per a la rehidratació de tires es va fer servir *DeStreak*; per a les mostres, DTT.
- Tires d'isoelectroenfocament (IPG) pH 6-11 de 7 cm o 11 cm (ref. 17-6001-94 o 17-6001-95; GE Healthcare)
- Tampó d'equilibrat SDS
 - Tris Base 50 mM pH 8,8
 - Urea 7 M
 - Glicerol 30% (v/v)
 - Blau de bromofenol
 - SDS 2% (p/v)
 - DTT 10 mg/mL (ref. 17-1318-01; GE Healthcare)
 - Iodoacetamida (IAA) 25 mg/mL
- Agarosa
 - Agarosa 0,5% (p/v) (ref. 50005; Lonza)
 - Tris Base 25 mM
 - SDS 0,1% (p/v)
 - Glicina 192 mM
 - Blau de bromofenol

2.5.3. Aparells

- Aparell d'IEF (Ettan IPGphor; GE Healthcare). Cedit pel grup IIBB - Laboratorio Proteómica CSIC/UAB de l'UAB.

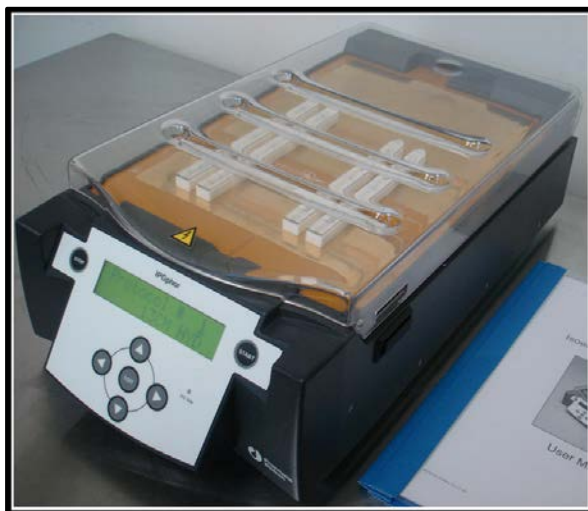


Figura 100. Ettan IPGphor. Aparell d'isoelectroenfocament en una dimensió de la casa comercial GE Healthcare.

2.5.4. Procediment

Prèviament a l'IEF, era necessari preparar la tira per rehidratació amb tampó de rehidratació que contingués amfòlits del mateix interval de pH que la tira. Per fer-ho, es va col·locar la tira a l'interior del sarcòfag de ceràmica amb el gel d'acrilamida cap per avall, en contacte amb el tampó de rehidratació i es va deixar durant 12-15 hores a 20 °C (Figura 101 – A). Acabada la rehidratació, es va guardar la tira a -20°C fins al moment de fer servir.

La mostra, després de precipitar-la en TCA, es va dissoldre en tampó de rehidratació amb *IPG buffer* (sonicació en fred) i es va carregar en la tira via carregador de mostra (Figura 101 – B). Es va enfocar l'aparell d'IEF, a les condicions de 50 μ A i a 20°C fins a un voltatge acumulat de 25.000 Vhr. L'aparell es va programar perquè el voltatge augmentés de manera graduada seguint els passos:

- 1 hora fins a 500 V
- 1 hora fins a 1.000 V
- 1 hora fins a 5.000V
- 5.000 V fins a 25.000 Vhr

Un cop assolit el voltatge desitjat, es va guardar la tira d'IEF a -20°C fins al seu ús en un assaig SDS-PAGE. Les tires es van guardar a l'interior de mitja pipeta de cultius cel·lulars de 25mL i tapats els extrems amb paper l'alumini per evitar la contaminació de les mostres ja enfocades en 2DE. Per iniciar la segona dimensió en l'SDS-PAGE, va ser necessari equilibrar la tira en tampó d'equilibrat amb DTT

durant 15 minuts; si l'objectiu del gel va ser el tint en plata, es va fer un segon equilibrat també de 15 minuts en tampó d'equilibrat però amb IAA. Una vegada acabat l'equilibrat, la tira ja es podia fer servir en l'SDS-PAGE. En aquest procediment no es prepara un gel concentrador, sinó que la tira és immobilitzada sobre el gel separador amb agarosa.

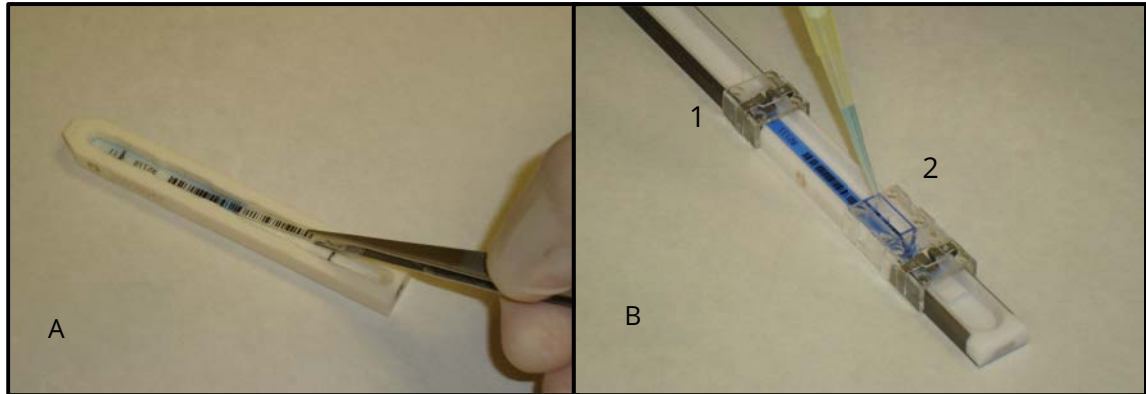


Figura 101. Electroforesi bidimensional de l'LPL. **A)** Rehidratació de la tira d'IEF en el sarcòfag de ceràmica; **B)** Col·locació de la tira d'IEF i càrrega de la mostra. 1 - Elèctrodes; 2 - "Cup-loader"

2.6. Immunoprecipitació de l'LPL

La immunoprecipitació (IP) de proteïnes és una tècnica que permet la purificació i concentració d'una proteïna -antigen d'un determinat anticòs- gràcies a l'especificitat de reconeixement entre l'antigen i l'anticòs. Per això, cal que l'anticòs usat en el procés estigui unit a un suport sòlid i immobilitzat.

2.6.1. Fonament del mètode

La IP depèn de la unió d'anticòssos en un substrat sòlid, ja sigui de forma directa o indirecta (per afinitat a proteïna A o G). Posteriorment, la mostra es barreja amb l'anticòs immobilitzat i, si la proteïna objectiu de l'anticòs és present a la mostra, quedarà retinguda. Finalment, la proteïna s'elueix de l'anticòs per diferents mètodes (solució àcida, força iònica,...). El mètode d'unió anticòs-substrat sòlid i d'elució de la proteïna determinaran la complexitat de la composició de l'eluit, per la presència o no de l'anticòs emprat.

En el nostre cas, vam treballar amb 4 variants de la IP (Figura 102). Les diferents metodologies (IP-1, IP-2, IP3 i IP-4) varien principalment en el suport (matriu de *Sepharose* en IP-1, -2 i -3 o metàl·lica en IP-4), en la presència de l'anticòs en l'eluit (IP-2 i IP-3) o no (IP-1 i IP-4) o el suport en què es desenvolupa l'assaig.

Esquematzació del funcionament de les immunoprecipitacions

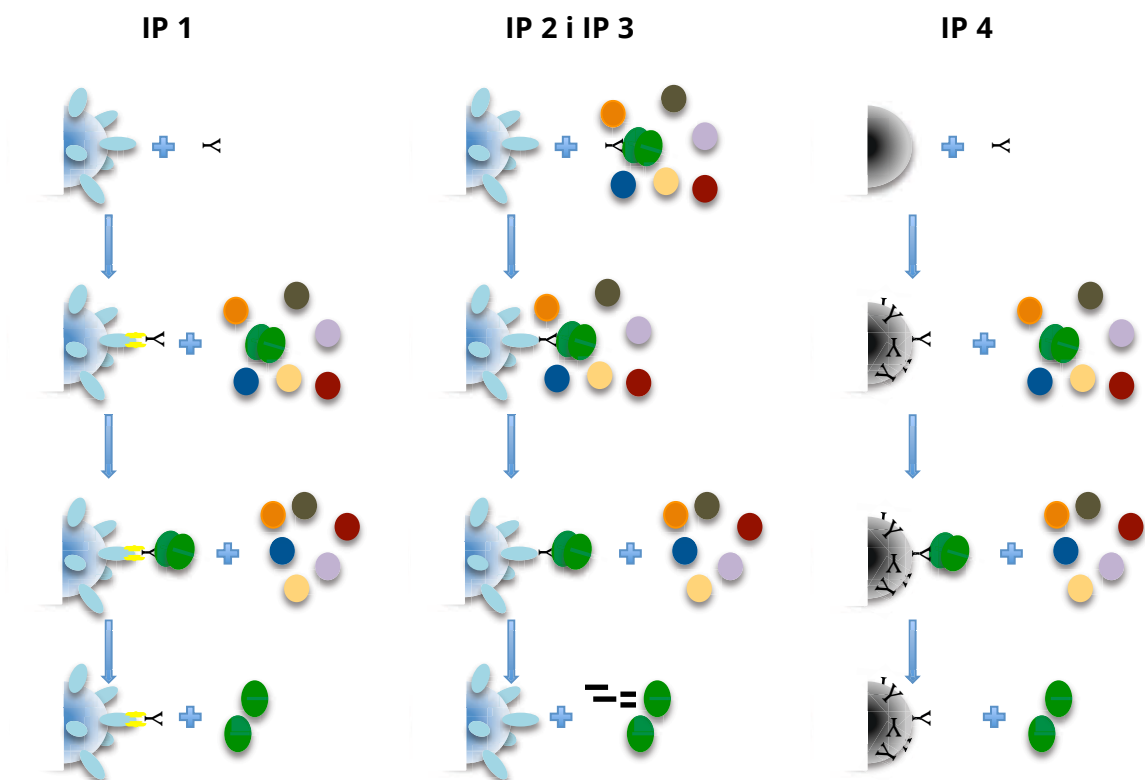


Figura 102. Mètodes d'immunoprecipitació. Esquemes teòrics del funcionament de cada immunoprecipitació utilitzada per a l'LPL. La matriu (*Sepharose* o esfera metàl·lica) que retén l'anticòs 5D2 (Y), separa l'LPL (esfera verda) de la resta de proteïnes (esferes d'altres colors). Finalment, l'LPL s'elueix de la matriu, ja sigui conjuntament amb l'anticòs (IP2 i IP3) o sola (IP1 i IP4).

IP-1: Suport en columna d'IP

Reactius

- Micro Bio-Spin Columns (ref. 732-6204; BIO-RAD)
- Protein G Sepharose 4 Fast Flow (ref. 17-0618-01; GE Healthcare)
- 5D2 (IgG) *mouse anti-human LPL* (cedit pel Dr. Brunzell, University of Washington, Seattle, USA)
- Tampó borat 0,2 M pH 9
- Tampó borat-DMP pH 9
 - Tampó borat 0,2 M
 - *Dimethyl pimelimidate* (DMP) 5 mg/mL (ref. 21667; Thermo Scientific)
- Tampó TBS pH 7,2
 - Tris 25 mM
 - NaCl 150 mM
- Tampó glicina 0,2 M pH 2,5
- Tampó de lisi pH 7,4
 - HEPES 50 mM
 - NaCl 150 mM
 - Triton X-100 1% (v/v)

- Inhibidors de proteases
 - Phenylmethylsulfonyl fluoride 1 mM (ref. P7626; Sigma-Aldrich)
 - Leupeptin 1 µg/mL (ref. L2884; Sigma-Aldrich)
 - Aprotinina 1 µg/mL (ref. A6279; Sigma-Aldrich)
 - Pepstatin 1 µg/mL (ref. P5318; Sigma-Aldrich)

Procediment

L'experiment d'IP es va dur a terme en columnes i amb proteïna G unida a substrat sòlid de *Sepharose*.

Per aquest procediment, cada vegada que es va fer un rentat o incubació, s'hi van afegir 500 µL de tampó i es va descartar la fase líquida per centrifugació (1.000 x g durant 30 segons). Primer de tot, es va unir covalentment els anticossos a la proteïna G de les boles. Per fer-ho:

- Es va incubar durant 1 h a temperatura ambient en orbital, una columna amb 50 µL de *Sepharose*-proteïna G i 4 µg d'anticòs 5D2.
- Es va centrifugar la columna per eliminar el tampó i es van fer dos rentats en tampó borat per eliminar l'accés d'anticossos no units a la proteïna G.
- Es va afegir tampó borat-DMP a la columna i es va deixar 30 min més a temperatura ambient en orbital. El DMP uneix covalentment els anticossos a la proteïna G.
- Es van fer onze rentats: els quatre primers de tampó TBS (a fi d'eliminar l'excés de DMP), quatre amb tampó glicina (per tal d'aturar la reacció d'unió, s'hi afegeixen amines primàries) i, finalment, es van fer tres rentats més de tampó TBS.

En paral·lel a tot aquest procés, també es va incubar i tractar una columna sense anticòs.

En el moment en què ja teníem a punt les columnes amb l'anticòs unit a la *Sepharose*, per començar la IP, es va equilibrar la columna amb un rentat en tampó de lisi. La mostra, després de la precipitació, va ser dissolta en tampó de lisi. A continuació es va afegir la mostra a la columna i es va deixar incubant 2 hores a temperatura ambient o tota la nit a 4°C. Acabada la incubació de la mostra, es va descartar la mostra de la columna per centrifugació (fracció anomenada "no lligada") i es va rentar la columna fins a 5 vegades amb tampó de lisi (fraccions anomenades "rentats"). Finalment, per eluir la mostra, es va afegir tampó glicina i es va centrifugar per aconseguir l'elúit. El pH de l'elució es compensava amb Tris 1 M pH 10. En el nostre cas, vam variar el volum d'elució: primer ho vam fer amb 50 µL i, a continuació, amb 100 µL, tal i com descrivia el procediment. Vam provar d'eluir en menys volum per poder carregar directament en el WB tota la mostra eluïda i no haver-la de precipitar.

Si la mostra no es va fer servir immediatament, es va guardar a -80°C fins al seu moment d'ús.

IP-2: Suport en tub Eppendorf

Un altre model d'IP es basa en treballar en microtubs eppendorf de plàstic d'1,5 mL enlloc de columnes. En aquest cas, al centrifugar el tub (com en el cas de treballar amb micro-columnes, 1.000 x g durant 30 segons) se separa la part en suspensió (mostra no lligada) de la mostra unida a les boles de *Sepharose*-proteïna G. Amb cura, es pot separar el volum no lligat sense endur-se el substrat de *Sepharose*.

Reactius

- Tampó d'incubació pH 7,4
 - NaCl 137 mM
 - KCl 2,68 mM
 - KH₂PO₄ (anhidre) 1,47 mM
 - Na₂HPO₄ (anhidre) 8,03 mM
 - Tween-20 1% (v/v)
- Protein G Sepharose 4 Fast Flow (ref. 17-0618-01; GE Healthcare)
- 5D2 (IgG) *mouse anti-human LPL* (cedit pel Dr. Brunzell, University of Washington, Seattle, USA)
- Tampó de rentat pH 7,2
 - HEPES 50 mM
 - NaCl 150 mM
 - glicerol 10%
 - Triton X-100 0,1%

Procediment

El primer pas va ser netejar les boles de *Sepharose* del tampó de conservació del kit (etanol al 20%), amb el tampó de rentat. Habitualment, abans de barrejar la *Sepharose* i la mostra, es fa un rentat de la mostra amb les boles sense anticòs per eliminar proteïnes amb unió inespecífica a la matriu. Vam saltar aquest pas perquè ja treballàvem amb una mostra parcialment purificada provinent de les fraccions de l'elució de la purificació parcial i per reduir al mínim les pèrdues d'LPL.

La mostra, després de la precipitació va ser dissolta en 500 µL de tampó d'incubació. Per iniciar la IP, es va deixar en incubació durant tota la nit a 4°C la mostra juntament a 4 µg d'anticòs 5D2 i a les boles de *Sepharose* amb proteïna G. Passada aquesta incubació, es va centrifugar el microtub amb la mostra i es va recollir la part superior (fracció no lligada). A continuació es van fer quatre rentats més amb 500 µL de tampó d'incubació. Finalment es van afegir 500 µL més de tampó d'incubació, es va bullir el conjunt [mostra+anticòs+*Sepharose*] durant 10 minuts al bany maria, es va centrifugar per darrera vegada i es va recollir el sobrenedant, on hi havia la mostra -i l'anticòs- eluïda per temperatura de la matriu de *Sepharose*.

Si la mostra no es va fer servir immediatament, es va guardar a -80°C fins al seu moment d'ús.

IP-3: Suport en columna de purificació d'IgG

També ens vam plantejar l'ús de columnes de purificació d'immunoglobulines (IgG). En el nostre grup ja teníem experiències prèvies del bon funcionament d'aquestes columnes, tant en la capacitat per purificar IgG com per recuperar l'LPL.

Reactius

- HiTrap Protein G HP (ref. 17-0404-03; GE Healthcare)
- Tampó d'incubació pH 7,4
 - NaCl 137 mM
 - KCl 2,68 mM
 - KH_2PO_4 (anhidre) 1,47 mM
 - Na_2HPO_4 (anhidre) 8,03 mM
 - Tween-20 1% (v/v)
- 5D2 (IgG) *mouse anti-human LPL* (cedit pel Dr. Brunzell, University of Washington, Seattle, USA)
- Tampó fosfat (Na_2HPO_4) 20 mM pH 7
- Tampó d'elució per acidesa pH 2,7
 - glicina 0,1 M
- Tampó d'elució per força iònica pH 7
 - Na_2HPO_4 20 mM
 - NaCl 2,5 M

Procediment

El procediment d'ús habitual d'aquestes columnes implica que, després de rentar la columna amb tampó fosfat, la mostra de la qual se'n vulguin purificar les immunoglobulines és diluïda fins a 500 μL en aquest mateix tampó. En aquest moment les IgG resten unides a la proteïna G. La columna es renta durant 5 minuts més per eliminar les proteïnes no lligades i, finalment, s'elueix la mostra de la proteïna G amb una solució àcida. Als tubs on es recull l'eluit, es compensa el pH amb tampó Tris 1 M pH 9.

El primer pas, va ser dissoldre la mostra precipitada en 500 μL de tampó d'incubació. En fer l'adaptació del procediment al nostre interès d'immunoprecipitar l'LPL, prèviament a passar les IgG per la columna, vam haver d'incubar la mostra amb l'anticòs (4 μg d'anticòs 5D2) durant tota la nit a 4°C en orbital. Aquest és el temps que deixem de reconeixement entre antigen-anticòs en el procés del WB i que s'aplica a d'altres processos similars. A més, també vam provar d'eluir la mostra amb tampó d'elució per força iònica, de la mateixa manera com es fa en les columnes de purificació parcial d'heparina-*Sepharose*.

En aquesta IP, l'eluit de la columna va incloure, juntament amb l'LPL, les IgG, ja que vam fer servir un mètode pensat originàriament per a la purificació d'anticòsos. Si la mostra no es va fer servir immediatament, es va guardar al congelador (-80°C) fins al seu moment d'ús.

IP-4: Suport en tub Eppendorf i matriu metàl·lica

Es va treballar amb una metodologia que conté un suport sòlid molt més inert que la *Sepharose*, per reduir possibles unions inespecífiques de l'LPL. A més, uneix covalentment l'anticòs al suport, per evitar l'elució de l'anticòs. Aquest suport són unes boles metàl·liques, les quals faciliten el procés de manipulació de la mostra, ja que quan cal separar la part líquida (no lligat) del suport metàl·lic, només cal apropar el tub a una base magnètica i apareix una banda fosca al tub: les boles magnètiques. En aquest moment es pot retirar el líquid sense perill d'endur-se la part lligada.

Reactius

- Kit "Direct Magnetic IP/Co-IP" (ref. 88828; Pierce – Thermo Scientific)
- 5D2 (IgG) *mouse anti-human LPL* (cedit pel Dr. Brunzell, University of Washington, Seattle, USA)
- Tampó de lisi/rentat:
 - Tris 25 mM
 - NaCl 150 mM
 - EDTA 1mM
 - NP40 1%
 - glicerol 5%
- Tampó d'etanolamina 3 M pH 9

Procediment

Per aquesta tècnica d'IP, primer de tot es va unir l'anticòs a les boles magnètiques. Per aquest procediment, es van seguir les instruccions del kit comercial. Breument:

- Es va incubar durant 30-60 minuts 4 µg d'anticòs 5D2 juntament amb el substrat metàl·lic.
- Es va aturar la reacció amb el tampó d'etanolamina i se'n va eliminar l'anticòs que hagués quedat en excés.
- Es va canviar el tampó d'etanolamina per tampó de lisi.

Una vegada la matriu sòlida ja va estar a punt, es va preparar la mostra. Per això, va ser dissolta, després de la precipitació en 500 µL del tampó de lisi/rentat. Tot seguit, es va incubar la mostra amb l'anticòs unit covalentment a la matriu metàl·lica durant 2 hores a temperatura ambient. Finalment, es va rentar la mostra (500 µL del tampó de lisi/rentat) i es va eluir l'LPL unida a l'anticòs per pH àcid.

2.7. Gel diferencial d'electroforesi 2DE (DIGE)

Els resultats obtinguts en 2DE mai són totalment idèntics, en part per les petites diferències en la polimerització dels gels d'acrilamida, petites variacions en el camp elèctric durant l'enfocament o la migració de la mostra, fluctuacions de temperatura, etc. Aquestes variables poden emascarar resultats o generar diferències inexistents entre diversos assajos.

La tècnica del gel diferencial d'electroforesi 2DE (*Difference gel electrophoresis*, DIGE) permet enfocar, fer migrar i identificar dues o més mostres diferents en un sol assaig. Així, els diferents paràmetres no controlables durant els diferents punts, afecten de la mateixa manera a les diferents mostres i s'obtenen resultats que són comparables entre si.

2.7.1. Fonament del mètode

Aquesta tècnica es basa en marcar les lisines de les proteïnes d'una mostra amb un fluoròfor que pot ser detectat a una longitud d'ona determinada (Unlu et al., 1997). Per a cada mostra que es vulgui analitzar en un mateix assaig, cal marcar-la amb un fluoròfor diferent. Al final de l'experiment, es llegeix el gel a les diferents longituds d'ona per veure només un determinat fluoròfor cada lectura, i per tant, únicament una de les mostres analitzades. Finalment, se superposen les imatges i es poden detectar diferències entre les diferents mostres (Figura 103).

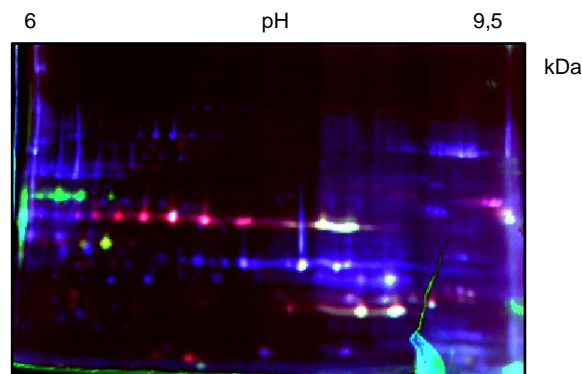


Figura 103. Imatge obtinguda per la metodologia del 2DE-DIGE. Els tres colors dels fluoròfors (vermell, verd i blau) amb què s'han marcat les tres mostres se superposen per estudiar col-localitzacions de proteïnes entre les diferents mostres.

2.7.2. Reactius

- Tampó DIGE-Tris pH 8,5
 - Tris 20 mM
 - Urea 7 M
 - Tiourea 2 M (RPN6301; GE Healthcare)
 - CHAPS 2% (p/v)
- Fluoròfors Cy 2, Cy 3 i Cy 5 (CyDye DIGE Fluor Minimal Labeling Kit; ref. 25-8010-65; GE Healthcare)
- Solució de lisina 10 mM
- Tampó DIGE
 - Urea 7 M
 - Tiourea 2 M (RPN6301; GE Healthcare)
 - CHAPS 2% (p/v)
 - DTT 36 mM (ref. 17-1318-01; GE Healthcare)
 - Tampó IPG 1% (v/v) (IPG buffer, pH 6-11; ref. 17-6001-78; GE Healthcare)

2.7.3. Aparells

- Escàner de fluorescència (Typhoon FLA 9500; GE Healthcare)

2.7.4. Procediment

Tota la manipulació de les mostres de les reserves de diferents purificacions parcials de l'LPL es va fer en fred i, sempre que es va poder, a les fosques o com a mínim sense fluorescents (això inclou l'IEF i la migració en SDS-PAGE). El procediment per dur a terme el DIGE va implicar la precipitació amb TCA de les mostres i dissoldre-les en 30 μ L de tampó DIGE-Tris sense sonicar-les. Mentre es deixava que les mostres es dissolguessin en el nou tampó, en un microtub de 0,5 mL es va preparar la mescla de treball o *working solution*, que era 0,6 μ L de dimetilformamida (DMF) i 0,4 μ L del fluoròfor. Era necessari preparar una solució de treball de cada fluoròfor (Cy 2, Cy 3 o Cy 5) per a cada mostra.

Tant bon punt les solucions de treball (cadascuna amb el seu fluoròfor) van estar a punt, es va afegir una mostra a cada fluoròfor. Després d'agitar les mostres i centrifugar-les (16.100 x g durant 10 segons), es van incubar durant 30 minuts a 4°C i a les fosques. Passat aquest temps, s'hi va afegir 1 μ L de solució de lisina, es va tornar a agitar, centrifugar i es va deixar en incubació durant 10 minuts més a 4°C i a les fosques. Finalment, s'hi va afegir 32 μ L de tampó DIGE. Aleshores, després d'agitar i centrifugar les mostres, es van ajuntar tots els volums en un sol tub i es va carregar a l'IPGphor (GE Healthcare) (Figura 100) per començar l'enfocament per pl.

En aquest punt, la mostra va seguir el procediment de la 2DE: primer la mostra es va enfocar segons el seu pl (en un gradient creixent de voltatge fins a 25.000 Vhr; i a continuació va migrar segons el seu pes molecular aparent (Figura 99) en un gel d'acrilamida, en aquest cas especialment, d'un mil·límetre de gruix.

Immediatament després que el front sortís del gel, es va aturar l'electroforesi i el gel es va transportar en una cambra humida fins a l'escàner de fluorescència. Mitjançant el programa ImageQuant TL (GE Healthcare) se'n van obtenir les imatges del gel a les diferents longituds d'ona d'emissió (498 nm, 550 nm i 650 nm per Cy 2, Cy 3 i Cy 5 respectivament) i se'n va fer el tractament de les imatges.

2.8. Substrat suïcida de lipases (DABGE)

Aquesta tècnica és una adaptació duta a terme al nostre grup, per M. Badia-Villanueva, a partir del protocol descrit en el treball de Morak et al. (2009), en què es descriu un mètode d'estudi de les lipases de teixits adiposos. Per això aquesta tècnica rep el nom de *differential activity-based gel electrophoresis* (DABGE).

Aplicat al nostre cas d'estudi, el DABGE no ens interessava per comparar totes les lipases de diferents teixits, sinó que l'objectiu que ens vam marcar va ser determinar si totes les isoformes de l'LPL eren igualment actives.

2.8.1. Fonament del mètode

El DABGE va un pas més enllà del DIGE i, enlloc de marcar amb un fluoròfor específic totes les proteïnes d'una mostra, únicament en marca els enzims amb activitat lipasa. Per això va ser necessari la síntesi de molècules que:

- 1) Siguin reconegudes per l'enzim en qüestió.
- 2) El producte de la reacció s'uneixi covalentment a l'enzim.
- 3) Tinguin una estructura de reconeixement o identificació posterior. Aquestes molècules són anomenades sondes de reconeixement d'activitat (ARP) (Figura 104).

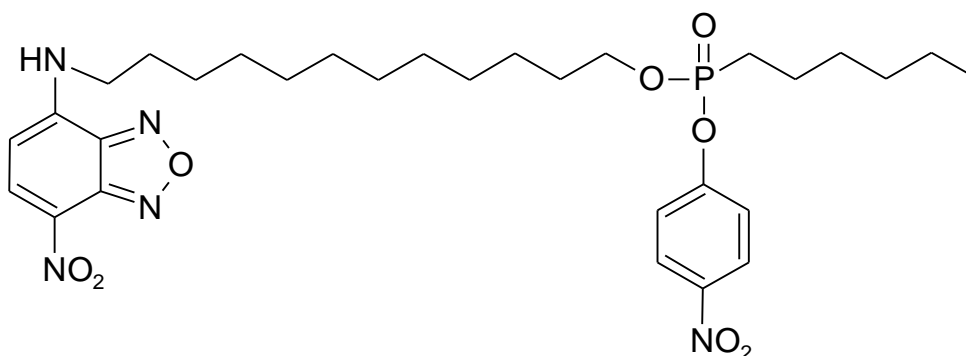


Figura 104. Estructura química del substrat suïcida. Diverses estructures químiques poden ser reconegudes per les lipases. En aquest cas, es va treballar amb l'ARP NBD-D-HP, la qual presenta una longitud d'ona d'excitació màxima a 488 nm i d'emissió a 530nm.

2.8.2. Reactius

- ARP (NBD-D-HP) 100 µmol/mL de cloroform (cedit pel Dr. Hermetter, Institute of Biochemistry, Graz, Àustria)
- Diluent de ARP
 - Triton X-100 10 M en cloroform (ref. CL02032500; Scharlau)

2.8.3. Aparells

- Escàner de fluorescència (Typhoon FLA 9500; GE Healthcare)

2.8.4. Procediment

Per poder treballar amb el substrat suïcida és necessari treballar amb mostra parcialment purificada en cromatografia d'afinitat que encara mantingui activitat lipàsica (que no hagi estat congelada) i sense BSA afegida. Per això, tant bon punt la mostra va ser eluïda de l'heparina-*Sepharose*, es va prosseguir amb l'assaig de DABGE.

Des del moment en què es va començar a treballar amb un fluoròfor, sempre que fos possible, es va mantenir la sonda del DABGE -en qualsevol dels passos- a les fosques.

En un vial de vidre, s'hi va afegir 100 µL de diluent d'APR i es va assecat el cloroform amb nitrogen gas. A continuació, en el mateix vial s'hi va afegir 100 µL d'APR, es va agitar i, de nou, se'n va assecat el cloroform amb nitrogen gas. En el vial de vidre amb l'ARP, s'hi va afegir la mostra acabada d'eluir de la columna d'heparina-*Sepharose*, es va agitar i es va deixar durant 1 hora en un bany a 25°C. Va ser de vital importància utilitzar mostres acabades d'eluir d'una columna d'heparina-*Sepharose* ja que:

- no poden contenir BSA, la qual presenta certa activitat lipasa (Goncharov et al., 2015; Kim et al., 2013; Mariam et al., 2014).
- la congelació/descongelació de les mostres pot reduir l'activitat lipasa.

En acabar aquesta incubació, es va precipitar la mostra amb TCA. Un cop evaporada l'acetona, la mostra es va dissoldre en tampó de rehidratació de 2DE i es va sonicar (6 x 5 segons amb pauses de 5 segons) en gel. A continuació, la mostra es va carregar en un enfocament per pl en l'IPGphor.

En aquest punt, la mostra va seguir el procediment de la 2DE: primer es va enfocar segons el seu pl (en un gradient creixent de voltatge fins a 25000 Vhr) i a continuació va migrar segons el seu pes molecular aparent en un gel d'acrilamida, en aquest cas especialment, d'un mil·límetre de gruix.

Immediatament després d'aturar l'electroforesi, el gel es va transportar en una cambra humida fins a l'escàner de fluorescència. Mitjançant el programa ImageQuant TL (GE Healthcare) se'n van obtenir les imatges.

2.9. Isoelectroenfocament en líquid (OGE)

Una limitació important a l'hora de la identificació de proteïnes provinents de gels 2DE és la digestió en gel, ja que limita l'ús de proteases a la tripsina i, a més, en redueix el rendiment d'extracció de pèptids del gel. En diversos casos, s'ha millorat el percentatge total d'identificació i seqüenciació de proteïnes gràcies a un fraccionament de la mostra segons el seu pl utilitzant la tècnica de l'isoelectroenfocament en líquid (*off-gel electrophoresis* - OGE) (Magdeldin et al., 2014). D'aquesta manera, mostres amb menor complexitat proteica són disponibles en líquid per treballar-hi en mètodes d'identificació de proteïnes que no es puguin aplicar a mostres de gels d'acrilamida.

Amb la caracterització de les diferències que generen les isoformes com a objectiu, es va plantejar l'OGE de les mostres provinents de purificacions parcials en cromatografia d'afinitat a heparina-*Sepharose*. D'aquesta manera, en acabar l'enfocament, es tindrien les diferents isoformes separades per pl i en líquid. Aquesta combinació (mostra separada per pl i en líquid) fins ara era impossible aconseguir: o es tenia el conjunt d'isoformes en líquid però barrejades o es tenia les isoformes separades però en gel d'acrilamida. Per tant, aquesta metodologia permet treballar amb cadascuna de les isoformes per separat, ampliar els tractaments de digestió i poder atribuir a cadascuna de les isoformes les PTM trobades.

2.9.1. Fonament del mètode

L'OGÉ es basa en el mateix principi de l'IEF: les proteïnes situades en un rang de pH diferent del seu pI tindran certa càrrega elèctrica total (ja sigui positiva o negativa) i, per tant, un cap elèctric les desplaçarà per aquest rang de pH fins que el seu pI coincideixi amb el pH (càrrega elèctrica total zero).

En el cas de l'OGÉ, es col·loquen damunt de la tira tot un seguit de septes que creen pouets ("piscines") (Figura 105), només comunicades entre ells a través de la tira d'IEF. En totes aquestes piscines es carrega mostra i s'inicia l'enfocament (Figura 105 - A). Per difusió passiva, les proteïnes de cada piscina entraran a la tira i, a partir d'aquest moment, es desplaçaran per la tira segons el seu pI (Figura 105 - B), tal i com passa en l'IEF. Quan la seva càrrega elèctrica total sigui zero s'aturaran i, de nou per difusió passiva, es desplaçaran cap a la fase líquida de la piscina corresponent al seu pI (Figura 105 - C).

2.9.2. Reactius

- Tampó de dissolució
 - Urea 7 M
 - Tiourea 2 M (RPN6301; GE Healthcare)
 - CHAPS 4%
- Tampó PROSS (*protein OFFGEL stock solution*)
 - Urea 7 M
 - Tiourea 2 M (RPN6301; GE Healthcare)
 - Glicerol 12% (v/v)
 - DTT 0,1 M (ref. 17-1318-01; GE Healthcare)
 - Tampó IPG (IPG buffer, pH 6-11; ref. 17-6001-78; GE Healthcare) 1,2% (v/v)
- Tira d'isoelectroenfocament de 24 cm pH 6-9 (ref. 17-6002-47; GE Healthcare)
- Solució de rehidratació
 - 960 µL de tampó PROSS
 - 240 µL ADMQ
- Oli (Immobiline DryStrip Cover Fluid; ref. 17-1335-01; GE Healthcare)

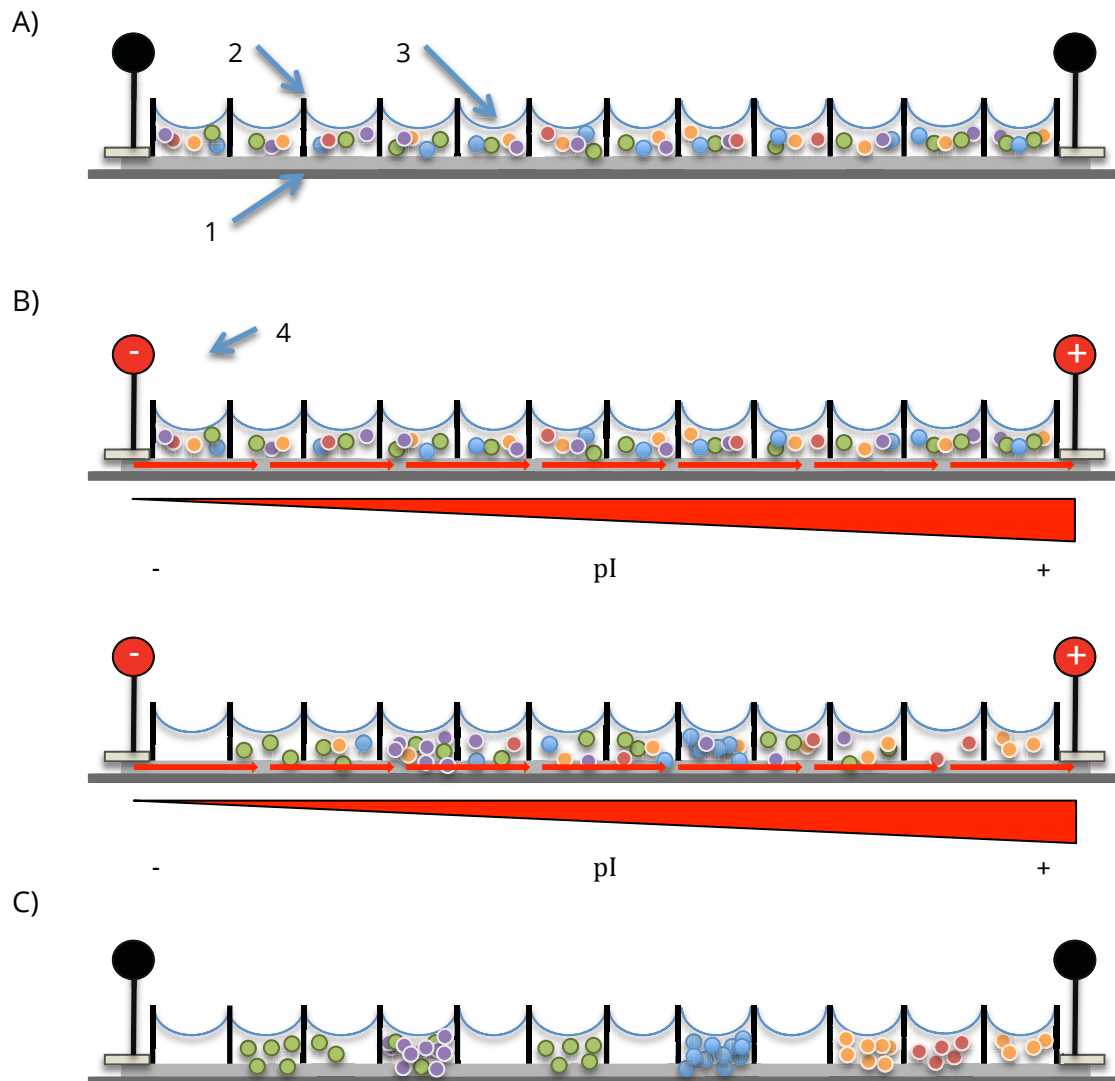


Figura 105. Esquematzació del funcionament de l'OGE. A) Muntatge de l'assaig: sobre una tira d'IEF (1) se situen un seguit de septes (2). En els espais generats pels septes és on es carrega la mostra (3). Cada color representa una proteïna diferent de la mostra. **B) Inici de l'isoelectroenfocament:** s'encenen els elèctrodes (4) i es genera un cap elèctric de punta a punta de la tira. Les proteïnes són enfocades a través de la tira segons el seu pI. **C) Final de l'isoelectroenfocament:** les proteïnes es troben separades en diferents piscines, segons pI. Una mateixa proteïna (p.e. mostra verda) en diferents piscines significa que presenta múltiples isoformes de pI.

2.9.3. Aparells

- Fraccionador (3100 OFFGEL Fractionator, Aligent Technologies)

2.9.4. Procediment

Prèviament, va ser necessari precipitar la mostra, afegir-hi 50 μ L tampó de dissolució i sonicar-ho (6 x 5 segons amb pauses de 5 segons) en gel. A continuació, es va dissoldre en 670 μ L d'aigua purificada i desionitzada i 2,88 mL

de tampó PROSS. Una vegada la mostra estava dissolta, es va guardar en fred mentre es va preparar la tira d'IEF.

Per al muntatge de l'IEF al fraccionador, es van seguir els següents passos:

- Es va col·locar la tira d'isoelectroenfocament de 24 cm al sarcòfag del fraccionador i immediatament a sobre s'hi va col·locar, el septe de 24 piscines.
- A cada piscina, s'hi va afegir 50 μL de solució de rehidratació.
- Es va mullar un tros de paper en tampó de rehidratació i es va col·locar un tros a cada extrem de la tira, al més a prop del marc de piscines.
- Es va deixar rehidratar la tira durant 15 minuts.
- Es va afegir 10 μL més de tampó de rehidratació a cada paper.
- Un cop la tira ja estava rehidratada, es va afegir 150 μL de mostra a cada piscina i es va tapar el septe amb una tapa de silicona per evitar la dessecació de les piscines.
- Es va afegir oli a cada extrem de la tira: 200 μL al positiu i 400 μL al negatiu.
- Un minut més tard, es va afegir 200 μL d'oli més a cada extrem. Finalment, 3 minuts després encara es van afegir 200 μL més a l'extrem positiu.

Es va iniciar l'isoelectroenfocament de la mostra a unes condicions limitants de:

- 4.500 V
- 50 μA
- 200 mW
- 64.000 Vhr

Quan l'enfocament va assolir els 64.000 Vhr, l'experiment es va aturar i es van recollir les fraccions. Per fer-ho, després de retirar la tapa de silicona per descobrir les piscines, es van recollir els volums que hi havia de cada fracció amb una micropipeta automàtica, sempre amb molta cura de no endur-se acrilamida de la tira. La recol·lecció dels volums acumulats a cada piscina es va haver de fer amb certa rapidesa, ja que les diferents piscines encara estaven comunicades a través de la tira i podia difondre el volum d'un espai a un de veí.

Les mostres van ser ràpidament congelades en neu carbònica i conservades a -80°C fins al seu ús.

2.10. Deglicosilació de proteïnes

Les glicosilacions són una PTM àmpliament descrita en proteïnes, amb efecte en la regulació de l'expressió i localització de les proteïnes on s'aplica (de Jong and van Eijk, 1988; Simsolo et al., 1992). A més, aquesta PTM ja està descrita com a causant de part de les isoformes de pI de l'LPL de cor de rata (Casanovas et al., 2009a). Per això, la deglicosilació de la mostra revelarà l'efecte d'aquesta PTM en el número d'isoformes en el nostre estudi.

Per altra banda, les glicosilacions s'han descrit com a elements de protecció contra les proteases. És per això que l'eliminació d'aquesta PTM pot millorar el percentatge de cobertura de seqüenciació de l'LPL.

2.10.1. Fonament del mètode

L'enzim PNGase F és un asparagin amidase (E.C. 3.5.1.52) que trenca l'enllaç d'una N₄-(acetil-β-D-glucosaminil)asparagina, típic de les N-glicosilacions de proteïnes. La reacció de l'enzim genera una N-acetil-β-D-glucosaminilamina i al pèptid hi queda un aspartat.

2.10.2. Reactius

- PNGase F (ref. 11 365 169 001; Roche)
- Tampó de reacció pH 7
 - tampó fosfat 250 mM
- Solució desnaturalitzant
 - β-mercaptoetanol 1 M
 - SDS 2% (p/v)
- Tritó X-100 15% (v/v)

2.10.3. Aparells

- Agitador Termomixer (Model 5436; Eppendorf)

2.10.4. Procediment

Després de precipitar la mostra (20 µg de proteïna total) amb TCA, es va afegir-hi:

- 30 µL d'aigua desionitzada.
- 10 µL de tampó de reacció.
- 2,5 µL de solució desnaturalitzant.

Aquesta barreja es va mantenir durant 10 minuts al bany maria. A continuació, es va centrifugar la mostra (30 segons a 16.100 x g) per fer baixar la condensació i s'hi va afegir:

- 2,5 µL de tritó X-100.
- 5 µL de PNGase F (en el control negatiu, aigua desionitzada).

Finalment, es va deixar la mostra a 37°C durant 5 hores a l'agitador, perquè es dugués a terme la reacció de deglicosilació. A la meitat del procés, se va centrifugar (30 segons a 16.100 x g) la mostra per recuperar la condensació. En acabar la incubació, les mostres es van tornar a centrifugar i es van guardar congelades (-80°C) fins al seu ús. Aquest tipus de mostra tant es va fer servir per SDS-PAGE (1DE o 2DE) com per la digestió en líquid amb proteases.

2.11. Defosforilació de proteïnes

L'addició de grups fosfats a proteïnes és un mecanisme àmpliament descrit com a PTM a fi de generar diferències respecte les característiques de la seqüència peptídica i d'alterar les propietats inicials de la proteïna modificada. Els principals aminoàcids objectiu de fosforilació són serines, treonines i tirosines.

En contraposició, la defosforilació (eliminació de grups fosfat mitjançant una fosfatasa) de proteïnes fosforilades serveix també com a mecanisme de regulació i modificació posttraduccional. Aplicat al nostre cas, la defosforilació de l'LPL serveix per descriure si les isoformes de l'LPL són degudes -totalment o parcial- a fosforilacions.

2.11.1. Fonament del mètode

Mitjançant l'addició de l'enzim fosfatasa alcalina a la mostra, es desenvolupa la reacció de defosforilació dels grups fosfats de les proteïnes presents a la mostra. En el cas d'afectar el pI d'alguna de les isoformes de l'LPL, el patró en resultarà afectat.

2.11.2. Reactius

- Fosfatasa alcalina (AP)(Alkaline phosphatase; ref. 10 713 023 001; Roche)
- Tampó bicarbonat pH 7,8
 - NH_4HCO_3 20 mM
- Àcid acètic 30% (v/v)

2.11.3. Aparells

- Agitador Termomixer (Model 5436; Eppendorf)
- Sonicador (UPH, Hielscher, Ultrasonics, Teltaw, Alemanya)
- Concentrador (SpeedVac SPD121P, Thermo Fisher, San Jose, CA, EUA)

2.11.4. Procediment

Després de precipitar la mostra, es va dissoldre en 40 μL de tampó bicarbonat i sonicar (30% d'amplitud, durant 5 segons amb pauses de 5 segons més, un total de 6 vegades) en gel. Un cop la mostra ja va estar dissolta, s'hi van afegir 5 μL de fosfatasa alcalina (AP). Es va deixar la mostra durant una hora a 37°C a l'agitador i, en acabar, s'hi van afegir 0,5 μL d'àcid acètic i es va assecar al concentrador. Un cop les mostres eren seques, es van guardar congelades fins al moment d'enfocar en 2DE. Aleshores, es van dissoldre en tampó de rehidratació amb *IPG buffer* i es van deixar enfocant fins a 25.000 Vhr. Arribat a aquest voltatge acumulat, es va aturar l'enfocament i les tires es van guardar congelades fins al seu ús.

3. Anàlisi de l'LPL per espectrometria de masses

3.1. Digestió de proteïnes

Per a l'estudi de les proteïnes mitjançant eines proteòmiques, darrerament s'han desenvolupat tot un seguit d'estratègies a fi d'optimitzar els resultats de l'anàlisi de les mostres. El tractament que es faci depèn de l'objectiu de la mostra: que la mostra es destini a la identificació de proteïnes per mapatge peptídic, o a la seqüenciació de pèptids per cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses determinarà part del tractament de la mostra. Un d'aquests tractaments és la digestió de proteïnes. Aquest procediment es pot aplicar a totes les metodologies, i el fet de treballar amb pèptids millora la sensibilitat en separació dels pèptids en assajos posteriors.

3.1.1. Fonament del mètode

La digestió de proteïnes és el procés pel qual una proteïna és hidrolitzada per un o més enllaços peptídics i es generen pèptids de menor pes molecular. Per a la digestió de proteïnes, també existeixen diversos procediments, ja siguin químics (proteases) o físics (temperatura, etc.). Tanmateix, el més utilitzat és la tripsina com a endopeptidasa, ja que presenta diversos avantatges: una alta eficiència de tall, enzim modificat per reduir l'autòlisi i tall a l'extrem C-terminal de lisines i arginines. Aquest darrer avantatge s'explica perquè en espectrometria de masses es treballa amb pèptids definits per la relació massa/càrrega (m/z), per tant, tots els pèptids generats per la tripsina presenten alguna càrrega positiva (de l'arginina o lisina). A més, per freqüència d'aquests aminoàcids, els pèptids generats per la tripsina, en general, queden dins de l'interval de detecció dels mètodes d'espectrometria de masses. Altres proteases són, per exemple, la quimotripsina o la glutamil endopeptidasa, les quals actuen sobre l'extrem C-terminal de triptòfan, tirosina i fenilalanina, o àcid aspàrtic i glutàmic, respectivament. Posterior a la digestió, en el cas d'haver-la fet en gel, cal un pas d'elució dels pèptids de la matriu d'acrilamida.

Digestió en gel (LP/IT/02-01 i LP/IT/04-02)

L'entrada de mostres d'aquesta metodologia van ser gels tenyits amb plata, provinents d'un SDS-PAGE. Si va ser un gel provinent d'una 2DE, l'anàlisi era de taques, enlloc de bandes. El fet de treballar amb proteïnes incloses en gels de poliacrilamida, va permetre una reducció de la complexitat de la mostra ja que es va poder decidir quines eren les mostres analitzades, i no calia analitzar totes les proteïnes del gel. A canvi d'aquesta millora, el fet de tenir les mostres incloses en un gel d'acrilamida, va limitar les possibilitats d'ús d'endopeptidases a una, la tripsina. També, la matriu d'acrilamida en què es troben les proteïnes dificulten l'elució dels pèptids obtinguts de la digestió amb tripsina i en redueixen el nombre total de pèptids tríplics disponibles per a l'anàlisi posterior.

Reactius

- Acetonitril (ACN) (ref. 1.00029.2500; Merck)
- ACN/aigua 1:1 (v:v) i àcid trifluoroacètic (TFA) (ref. 40967; Sigma) 0,25% (v:v)
- Tampó bicarbonat pH 7,8
 - NH_4HCO_3 20 mM
- Tampó de reducció pH 7,8
 - DTT 10 mM
 - NH_4HCO_3 20 mM
- Tampó de carbamidometilació pH 7,8
 - IAA 55mM
 - NH_4HCO_3 20 mM
- Tampó de digestió pH 7,8
 - Tripsina (ref. V5280; Promega)
 - NH_4HCO_3 20 mM
- ACN/aigua 1:1 (v:v) i TFA 0,1% (v:v)
- Tripsina (ref. V5280; Promega)

Aparells

- Concentrador (SpeedVac SPD121P, Thermo Fisher, San Jose, CA, EUA)
- Digestor automàtic (Digest ProMS; INTAVIS Bioanalytical Instruments AG, Colònia, Alemanya)

Procediment

Per evitar contaminar les mostres, cal sempre mantenir les mostres netes i aïllades de possibles contaminants. Per a l'extracció de les mostres dels gels, s'ha de treballar en una campana de flux laminar i netejar tot el material de treball amb etanol. La placa de vidre sobre la qual es col·loca el gel a retallar es neteja amb ACN.

A partir de la imatge del gel, es van retallar amb un bisturí o perforador (*punch*) les bandes (1DE) o taques (2DE) que es vulguin digerir. A continuació, es van trossejar i es van incloure en una placa de digestió.

La digestió de les mostres es va fer mitjançant un digestor automàtic. Breument, el procediment que es va seguir va ser el següent: rentar les mostres amb tampó bicarbonat i deshidratar-les amb un rentat en ACN. A continuació, es van tractar les mostres amb el tampó de reducció, tot seguit, amb el tampó de carbamidometilació i de nou rentades i deshidratades. Les mostres finalment es van incubar amb la tripsina. Els pèptids tríptics aconseguits de la digestió de les proteïnes es van extraure del gel a una placa de col·lecció mitjançant la solució ACN/aigua 1:1 (v:v) i TFA 0,25% (v:v).

Un cop passades les mostres a microtubs, es van assecar i van ser dissoltes en ACN/aigua 1:1 (v:v) i TFA 0,1% (v:v). Un cop dissoltes, les mostres van ser guardades a -80°C fins al moment de fer-ne ús.

Digestió en líquid (LP/IT/02-01 i LP/IT/03-02)

Les mostres que es van digerir en líquid van ser les reserves de les fraccions generades en purificacions parcials d'LPL per cromatografia d'afinitat. Per tant, van ser mostres molt més complexes que les analitzades des de gels d'acrilamida, però a canvi es van poder digerir amb una altra proteasa i no únicament la tripsina, a fi de generar pèptids diferents als tríptics. Aleshores, el conjunt de pèptids generats per la digestió, s'analitzen per cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses. Aquesta metodologia de treball s'anomena "*shotgun proteomics*".

Reactius

- Tampó de dissolució pH 8
 - Urea 6M
 - Tris HCl 50mM
- Tampó bicarbonat pH 7,8
 - NH_4HCO_3 25 mM
- Tampó de reducció
 - DTT 1M en tampó bicarbonat (ref. D5545; Sigma)
- Tampó d'alquilació
 - IAA 500mM en tampó bicarbonat (ref. I1149; Sigma)
- Solució de tripsina 0,1 mg/mL en tampó bicarbonat
- Solució de GluC (ref. V1651; Promega)
- Àcid trifluoroacètic (TFA) (ref. 40967; Sigma)
- Tripsina (ref. V5280; Promega)
- GluC (ref. V1651; Promega)

Aparells

- Agitador Termomixer (Model 5436; Eppendorf)

Procediment

Es va partir d'una mostra precipitada d'aproximadament 30 µg de proteïna total, la qual es va dissoldre en el tampó de dissolució (30 µL) i es va sonicar (1 segon fins a tres vegades) i centrifugar (14.000 x g durant 1 minut). A continuació, s'hi va afegir el tampó de reducció (concentració final del DTT 2mM) i es va deixar una hora a temperatura ambient. Passada aquesta estona, s'hi va afegir el tampó d'alquilació (concentració final de la IAA 7mM) i 30 minuts més a les fosques i a temperatura ambient. Finalment s'hi va afegir de nou tampó de reducció (fins a concentració final de DTT de 2mM). Tot seguit, ja es va poder afegir la proteasa, a una concentració final del 2% (p/p). Cada vegada que s'hi va afegir un tampó, la mostra es va remenar i centrifugar (23.500 g, 15 segons).

Aleshores es va deixar la mostra durant 18-20 hores a 37°C en agitació (350 rpm) perquè actués l'enzim.

Per aturar la digestió, s'hi va afegir TFA fins a una concentració final de 1% (v/v). Les mostres es van mantenir congelades (-80°C) fins al moment de fer-les servir.

3.2. Cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses en tàndem

Amb l'objectiu de determinar la seqüència d'aminoàcids dels pèptids obtinguts durant la digestió de proteïnes, ja sigui en gel o en líquid, les mostres es van analitzar per espectrometria de masses en tàndem. Aquesta tècnica consta de tres parts principals:

- la primera és una cromatografia líquida d'alta resolució (elueix els pèptids segons hidrofòbia)
- la segona és la font de ionització de pèptids (en el nostre cas, font del tipus electroesprai) per tal que els pèptids tinguin càrrega
- la tercera és un analitzador, el qual selecciona els pèptids d'interès del conjunt que entren, els fragmenta per col·lisió amb un gas inert i n'analitza l'estructura dels nous fragments segons la seva relació massa/càrrega.

3.2.1. Fonament del mètode

Durant la col·lisió de fragmentació del pèptid amb el gas inert, l'enllaç més propens a trencar-se és l'amida. Així, a l'analitzador dels ions hi haurà diferents combinacions de fragments de diferents longituds de seqüències peptídiques. A partir de els increments de massa entre els diferents ions del pèptid fragmentat, se'n pot deduir la seqüència d'aminoàcids del pèptid seleccionat per analitzar.

3.2.2. Reactius

- Solució de dilució
 - Àcid fòrmic 1% (v/v) (ref. 94318; Sigma)
 - Metanol 5% (v/v) (ref. 34966; Sigma)
- Solució A
 - Àcid fòrmic 1% (v/v) en aigua
- Solució B
 - Àcid fòrmic 1% (v/v) en ACN (ref. 1.00029.2500; Merck)

3.2.3. Aparells

- Sistema de masses (LTQ XL Orbitrap; ThermoFisher)
- Sistema de cromatografia (Agilent 1200 nanoflow; Agilent Technologies)

3.2.4. Procediment

Un volum final de 20 µL de mostra va ser carregat en un cartutx de preconcentració C18 (Agilent Technologies) connectat a una columna C18 de 15 cm de longitud i 100 µm de diàmetre intern (sistema de cromatografia Nikkyo Technos Co.). L'elució dels pèptids de la columna es va dur a terme durant 30 minuts a 0,4 µL/min en un gradient del 3 al 40% de solució B (en solució A; v/v). El sistema de cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) estava compost per una

nano-bomba capil·lar, una bomba binària, un micro-injector amb termòstat i una micro-vàlvula.

L'LTQ XL Orbitrap funcionava en el mode d'ió positiu amb un voltatge d'electrosprai de 1.8 kV.

L'anàlisi espectromètric va ser desenvolupat dependent de les dades obtingudes a cada moment: de cada anàlisi de pèptids (rang entre 300-1800 m/z) es van escollir els 10 més abundats a cada cicle i seguidament van ser estudiats els seus espectres de fragmentació. Aquest anàlisi d'espectrometria de masses en tàndem va ser desenvolupat a la trampa iònica lineal.

El conjunt de dades obtingudes de l'anàlisi dels pèptids es van fer servir per generar la seqüència de pèptids a través de la cerca en bases de dades.

3.3. Bases de dades

Les dades obtingudes de la cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses van ser comparades amb el programa SEQUEST (Proteome Discoverer v1.4 ThermoFisher), fent servir la base de dades obtinguda per *Macaca fascicularis* d'UniProtKB/Swiss-Prot.

Els paràmetres de les cerques es van ajustar a una tolerància de massa dels pèptids de 20 ppm, tolerància dels fragments de 0,6 Da, digestió per tripsina amb una tolerància de 2 errors de digestió, oxidació de metionines com a modificació dinàmica (+16 Da) i carbamidometilació de cisteïnes com a modificació constant (+57 Da).

A més, per les característiques de la digestió en líquid, es van afegir altres condicions de cerca en funció del tractament:

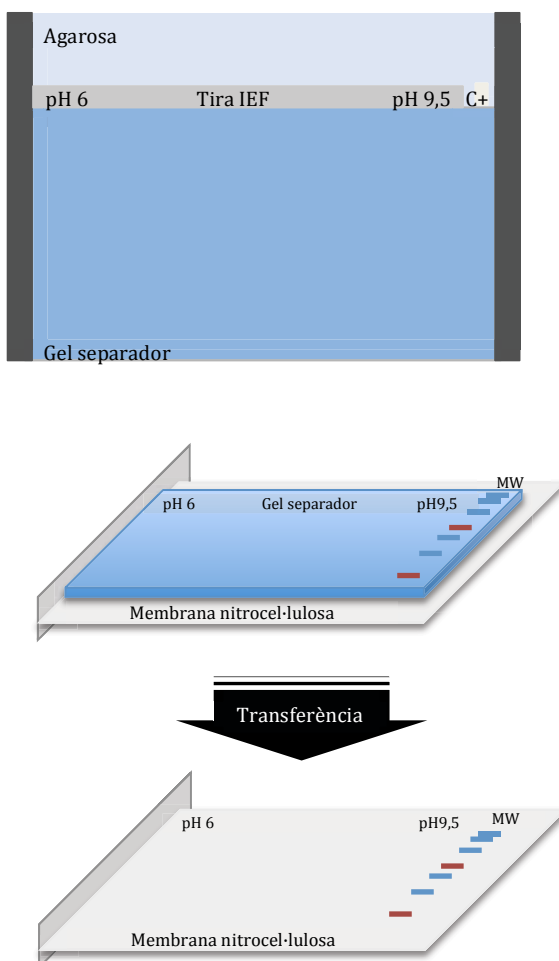
- Mostres deglicosidades:
 - o Enzim tripsina o Glu-C i amb el canvi d'aspartat a asparagina (+0,984 Da) com a modificació variable.
 - o Enzim tripsina o Glu-C i amb el canvi d'aspartat a asparagina (+0,984 Da) i acetilació de lisines (+42,011 Da) com a modificacions variables.
 - o Enzim tripsina o Glu-C i amb el canvi d'aspartat a asparagina (+0,984 Da) i nitracions de tirosines (+44,985 Da) com a modificacions variables.
 - o Sense cap enzim i amb el canvi d'aspartat a asparagina (+0,984 Da) com a modificació variable.
- Mostres sense deglicosilar:
 - o Enzim tripsina o Glu-C.
 - o Enzim tripsina o Glu-C i amb l'acetilació de lisines (+42,011 Da) com a modificació variable.
 - o Enzim tripsina o Glu-C i amb nitracions de tirosines (+44,985 Da) com a modificació variable.
 - o Sense cap enzim.

4. Mètodes estadístics

4.1. Creació del patró d'isoformes de pI de l'LPL

A fi de poder estudiar les diferències entre cada teixit del qual se n'havia purificat l'LPL, ens calia una metodologia que ens permetés treballar amb les imatges -els films fotogràfics revelats- obtingudes de cada 2DE resolta per WB (2DE-WB). El nostre objectiu era poder quantificar cada isoforma present a cada teixit -abundància- i poder-ne determinar el seu pI.

Per a la determinació del pI de cada isoforma, vam decidir mantenir sempre el pH de la tira d'IEF en un punt conegut: es va alinear l'extrem àcid de la tira d'IEF (pH 6) a un extrem del gel separador durant l'IEF i, posteriorment, aquest costat del gel també s'alineava amb la membrana de nitrocel·lulosa durant la transferència (Figura 106). D'aquesta manera, es mantenia la referència del pH 6 en un punt determinat a la imatge del film fotogràfic. Els passos a seguir es descriuen a les imatges A, B i C de la Figura 106:

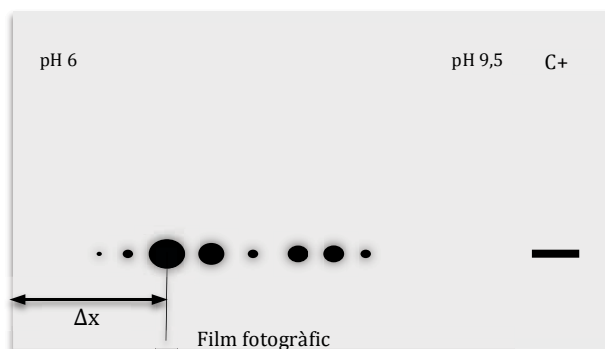


A) Durant la preparació de l'electroforesi posterior a un IEF, l'extrem àcid de la tira d'IEF se situa tant a l'esquerra com sigui possible, a fi de tenir el pH 6 a l'extrem esquerre del gel separador.

El control positiu (C+) pot incloure tant LPL bovina comercial com marcador de pes molecular aparent (MW). A continuació, l'agarosa immobilitza la tira i el control positiu.

B) En el muntatge de la transferència de les proteïnes des del gel d'acrilamida cap a la membrana de nitrocel·lulosa, l'extrem del gel corresponent al pH 6 es col·loca molt ben alineat amb l'extrem de la membrana. Així, es manté controlat el punt de pH 6 també en la membrana.

Acabada la transferència, en la membrana tenim el pH 6 a l'extrem esquerre de la nostra figura. A l'altre costat, hi veiem les diferents proteïnes de colors que conformen el MW.



C) En revelar la membrana en un film fotogràfic, es veuen les diferents isoformes i el control positiu (C+).

Figura 106. Traçabilitat del pH en assajos 2DE-WB. En els diferents passos en què es manipula la mostra, es va mantenir controlat un punt de pH. **A)** Instal·lació de la tira d'IEF en el gel d'acrilamida per l'SDS-PAGE. **B)** Transferència de les proteïnes des del gel d'acrilamida fins a la membrana de nitrocel·lulosa. **C)** Film fotogràfic revelat després de l'exposició a la membrana de nitrocel·lulosa.

Com que les tires d'IEF tenen un gradient de pH immobilitzat i lineal, a partir de la distància entre el punt de pH=6 i el centre de la isoforma de l'LPL, se'n pot determinar el punt isoelèctric, mitjançant la fórmula:

$$pI = \left\{ 6 + \left(\frac{\Delta pH}{long} * \Delta x \right) \right\}$$

on pI és el punt isoelèctric de la isoforma, 6 és el pH inicial de la tira, ΔpH és l'increment d'unitats del rang de pH de la tira, $long$ és la longitud de la tira (en centímetres) i Δx és la distància entre el punt de pH 6 i el centre de la isoforma (en centímetres).

Un dels principals problemes en treballar amb imatges procedents de WB és la manca d'estandardització dels processos per quantificar els resultats obtinguts. Aquest fet és degut a la manca de controls del procés i a la variabilitat intrínseca de la tècnica. En el nostre laboratori ja s'ha resolt altres vegades aquesta problemàtica mitjançant una mostra control, a la qual se li atribueix un valor en unitats arbitràries (UA) i es considera constant en els diferents assajos (Través et al., 2010). Així, els altres resultats obtinguts es poden semiquantificar a partir d'aquesta mostra control. Però en el nostre cas, no era possible aplicar aquesta solució ja que al treballar amb mostres enfocades per IEF, no disposàvem de l'espai requerit per incloure una mostra control.

Per resoldre com expressar la quantitat de cada isoforma, al final es va decidir fer-ho en percentatge: de cada film revelat, la suma de les intensitats del conjunt d'isoformes de l'LPL era de 100%. Per poder treballar d'aquesta manera, es va haver de suposar que el procés de precipitació de la mostra, el seu enfocament per IEF i la detecció per l'anticòs 5D2 eren constants per a totes les isoformes.

Mitjançant el programa informàtic de tractament d'imatges Multi Gauge (Fujifilm), es va determinar l'abundància relativa de cada isoforma respecte el total d'aquella exposició fotogràfica (Figura 107).

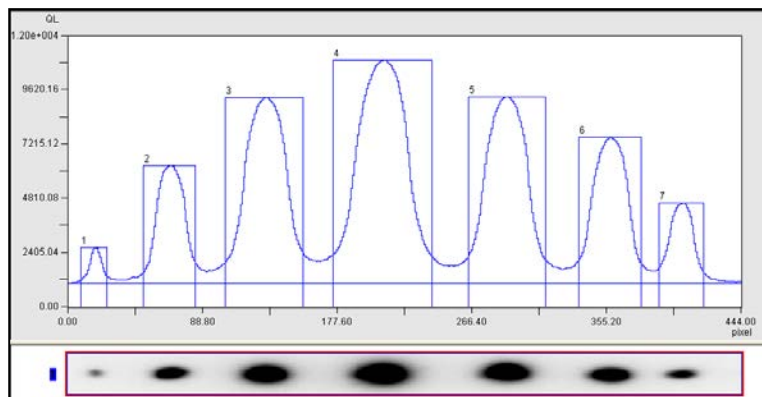


Figura 107. Determinació de l'abundància relativa de cada isoforma. De cada imatge obtinguda en film fotogràfic, se'n va quantificar el percentatge de cada isoforma mitjançant un programa de tractament d'imatge (Multi Gauge).

De cada 2DE-WB se'n van fer diverses exposicions de la mateixa membrana, a fi de tenir diversos valors d'abundància relativa de cada isoforma (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Una vegada calculats els pI de cada isoforma i quantificades les abundàncies relatives de diverses rèpliques de WB, es va fer la representació d'aquell teixit. La imatge resultant, es va anomenar el **patró** (Figura 108) de distribució d'isoformes de cada teixit.

Isoforma	Abundància				pI
	Exposició 1	Exposició 2	Exposició 3	Mitjana	
1	0,56	1,01	1,74	1,10	7,02
2	9,35	8,84	9,81	9,33	7,22
3	21,54	20,99	21,53	21,35	7,48
4	30,37	29,45	29,36	29,73	7,79
5	21,87	21,31	19,56	20,91	8,1
6	13,23	13,45	12,67	13,12	8,39
7	3,08	4,96	5,33	4,46	8,54

Taula 11. Abundància relativa de les isoformes de l'LPL en diferents exposicions d'un sol 2DE-WB. De cada exposició, se'n va quantificar els percentatges de cada isoforma i es van incloure els resultats en una taula, a fi de poder agrupar els resultats dels pI (veure **Figura 106**) i la mitjana de l'abundància relativa (veure **Figura 107**).

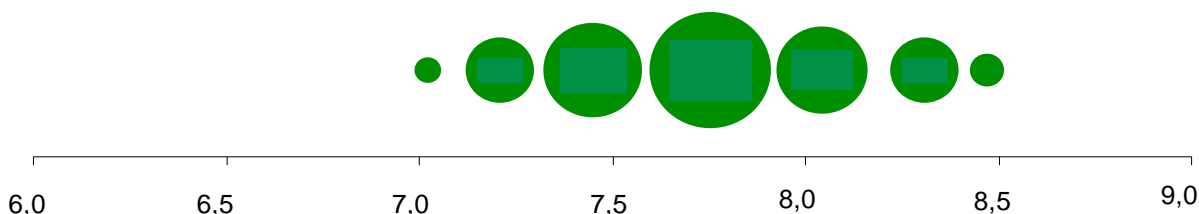


Figura 108. Exemple de patró d'isoformes d'LPL. A partir dels diferents valors d'intensitat de cada isoforma (representada per la quantitat de superfície) i els seu pI (eix horitzontal), es va dissenyar el seu patró, model de distribució d'isoformes d'LPL de cada teixit.

4.2. Comparació estadística del patró d'isoformes de pI de l'LPL

Amb l'objectiu de descriure estadísticament les diferències entre els patrons obtinguts de cada teixit, es va idear una metodologia que responia a aquesta meta. Per fer-ho, es va analitzar les dues variables que conformen els patrons: el pI de cada isoforma i la seva abundància relativa.

La comparació de les abundàncies de cada isoforma entre diferents teixits, només es va plantejar quan els seus punts isoelèctrics no eren diferents. El nostre interès requeria en veure com una mateixa isoforma (mateix pI) variava les seves abundàncies relatives entre diferents teixits.

Per treballar aquests aspectes, es van fer servir dos programes diferents: *Microsoft Excel* (Microsoft) i *R* (programa informàtic d'accés lliure per a la computació de dades estadístiques i la seva representació). Tot i que la part desenvolupada a l'*R* es pot dur a terme també amb l'*Excel*, el fet de treballar amb l'*R*, ens va permetre utilitzar un "script", un seguit de funcions de treball amb què es van analitzar les dades. Així, aquests resultats són totalment reproduïbles i aquesta metodologia es pot aplicar a qualsevol altre patró d'isoformes de característiques similars.

4.2.1. Estudi i comparació dels pI de diferents patrons

Anàlisi de la normalitat de residus i homoscedasticitat de variàncies

Per donar robustesa al mètode i als resultats, primer de tot, es va avaluar que els valors de pI de cada teixit seguien, en tots els casos, normalitat dels residus i homoscedasticitat de les variàncies.

Per aquesta anàlisi, entre tots els replicats de WB del mateix teixit, va ser necessari eliminar els valors de pI de les isoformes que només tinguessin un valor, ja fos perquè en les altres imatges no havia aparegut la isoforma o perquè fossin exactament el mateix valor en cadascun dels replicats (veure exemples a la Taula 12). Aquest pas va ser necessari per evitar que l'anàlisi de les variàncies sortís significatiu per error metodològic.

Isoforma	pl - dades crues		
	Assaig 1	Assaig 2	Assaig 3
1	6,56		
2	6,68	6,68	6,68
3	6,84	6,82	6,84
4	7,01	7	7,02
5	7,2	7,2	7,24
6	7,45	7,43	7,49
7	7,73		7,8
8	8,06	8,08	8,1
9	8,32	8,34	8,35
10	8,51	8,51	8,51

pl - simplificació		
Assaig 1	Assaig 2	Assaig 3
6,84	6,82	6,84
7,01	7	7,02
7,2	7,2	7,24
7,45	7,43	7,49
7,73		7,8
8,06	8,08	8,1
8,32	8,34	8,35

Taula 12. Tractament previ dels valors del pl. A la taula “pl - dades crues”, es va eliminar els valors de les isoformes 1, 2 i 10, ja fos perquè tenia una sola determinació (isoforma 1) o perquè, malgrat tenir diverses determinacions, tenien el mateix valor (isoformes 2 i 10). La taula de la dreta són els valors a partir dels quals es va poder calcular la normalitat de residus i l’homoscedasticitat de variàncies.

Un cop eliminats els pl amb un sol valor, es va crear un fitxer d’extensió .txt amb dues columnes:

data	teixit
6,84	1
6,82	1
6,84	1
7,01	2
7,00	2
7,02	2
7,20	3
7,20	3
7,24	3
7,45	4
7,43	4
7,49	4
7,73	5
7,80	5
8,06	6
8,08	6
8,10	6
8,32	7
8,34	7
8,35	7

Taula 13. Organització dels valors de pl per a l’estudi de la normalitat de residus i l’homoscedasticitat de variàncies. La columna “data” inclou els valors dels pl, mentre que a la columna “teixit” hi consta el número ordinal de cada isoforma (veure exemple de la **Taula 12**).

Tot seguit ja es va poder avaluar l'homoscedasticitat de les variàncies i la normalitat dels residus mitjançant les següents ordres de l'R:

```
Script R:  
  
# Lectura de dades  
plteixit<-read.table("teixit.txt", sep="\t", dec="," , header=TRUE)  
# Dades de treball  
attach(plteixit)  
# Visualització de les dades  
plteixit  
teixitdef<-as.factor(teixit)  
  
## Normalitat de residus  
fit = lm(data~teixitdef, data=plteixit)  
res = resid(fit)  
shapiro.test(res)  
  
## Homoscedasticitat de variàncies  
bartlett.test(data~teixitdef, data=plteixit)
```

Per a tots dos tests, es va obtenir el seu p -valor. En qualsevol cas, si aquest valor va ser inferior a 0,05 es va considerar vertadera la hipòtesi alternativa: la mostra no distribueix els residus com una població normal –per a la normalitat de residus- o bé la distribució de les variàncies de la població no és homogènia.

Una vegada l'anàlisi de l'homoscedasticitat de variàncies i la normalitat de residus es va completar, en funció dels resultats, es va poder prosseguir amb la comparació dels pl de les isoformes de diferents teixits i amb l'estudi de les seves distribucions.

Comparació dels pl

Per comparar si diferents teixits tenien isoformes del mateix pl, el que es va fer va ser crear l'interval de confiança (CI) de cada isoforma. Si el valor dels intervals de confiança se solapaven entre diferents teixits, eren la mateixa isoforma.

En aquest apartat, es va treballar amb les mitjanes dels pl, aconseguides a partir dels diferents replicats de WB. Per calcular el CI de les isoformes de cada patró, primer va ser necessari calcular el "pivot" de cada teixit. El "pivot" és el valor que determina l'amplitud de l'interval de confiança, el valor que se suma o resta a la mitjana dels valors observats.

$$CI = \bar{X} \pm 1,96 * \sqrt{MQ_R}$$

on CI és el valor superior i inferior de la mitjana (\bar{X}) quan se li suma o resta, respectivament, el valor del pivot. Aquest valor del pivot s'obté a partir d' MQ_R , aconseguit mitjançant l'script de l'R:

```

Script R:
# Lectura de dades
plteixit<-read.table("teixit.txt", sep="\t", dec=".", header=TRUE)
# Dades de treball
attach(plteixit)
# Visualització de les dades
plteixit
teixitdef<-as.factor(plteixit)

# Obtenció MQR
summary(aov(data~teixitdef, data=plteixit))

```

Un exemple de l'obtenció del valor d' MQ_R en el cas del teixit "CORadult" és:

```
summary(aov(data~CORadef, data=plCORadult))
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
CORadef	7	6.859	0.9799	2594	<2e-16 ***
Residuals	15	0.006	0.0004		

4.2.2. Estudi i comparació de les abundàncies relatives de les isoformes de *pl* de l'LPL entre diferents patrons

En els casos en què els CI de les isoformes de diferents teixits se solapaven, es va poder estudiar si, malgrat tenir les mateixes isoformes, tenien abundàncies relatives diferents o, per altra banda, l'abundància de les isoformes era la mateixa en els teixits.

La comparació de les abundàncies es va fer mitjançant un test ANOVA d'un factor, on la variable dependent era el percentatge i el factor era el teixit. Els valors es van considerar diferents quan el p -valor va ser menor de 0,05, 0,01 o 0,001; i es va representar en el gràfic mitjançant *, ** o *** respectivament.

VII. BIBLIOGRAFIA



- Adelman, R., Saul, R.L., and Ames, B.N. (1988). Oxidative damage to DNA: relation to species metabolic rate and life span. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 2706-2708.
- Alousi, A.A., and Mallow, S. (1964). Effects of Hyperthyroidism, Epinephrine, and Diet on Heart Lipoprotein Lipase Activity. *The American journal of physiology* 206, 603-609.
- Arnaudo, A.M., and Garcia, B.A. (2013). Proteomic characterization of novel histone post-translational modifications. *Epigenetics & chromatin* 6, 24.
- Augustin, J., Freeze, H., Tejada, P., and Brown, W.V. (1978). A comparison of molecular properties of hepatic triglyceride lipase and lipoprotein lipase from human post-heparin plasma. *The Journal of biological chemistry* 253, 2912-2920.
- Azevedo, C.C., Guzman-Guillen, R., Martins, J.C., Osorio, H., Vasconcelos, V., da Fonseca, R.R., and Campos, A. (2015). Proteomic profiling of gill GSTs in *Mytilus galloprovincialis* from the North of Portugal and Galicia evidences variations at protein isoform level with a possible relation with water quality. *Marine environmental research* 110, 152-161.
- Badia-Villanueva, M. (2018). Estudi de les característiques funcionals de les isoformes de punt isoelèctric de la Lipoproteïna lipasa. In *Bioquímica i Biologia Molecular* (Barcelona: Universitat de Barcelona).
- Badia-Villanueva, M., Carulla, P., Carrascal, M., Abian, J., Llobera, M., Casanovas, A., and Dolores Lopez-Tejero, M. (2014). Lipoprotein lipase isoelectric point isoforms in humans. *Biochemical and biophysical research communications* 445, 480-485.
- Ball, K.L., Speake, B.K., and Robinson, D.S. (1986). Effects of adrenaline on the turnover of lipoprotein lipase in rat adipose tissue. *Biochimica et biophysica acta* 877, 399-405.
- Ballart, X., Siches, M., Peinado-Onsurbe, J., Lopez-Tejero, D., Llobera, M., Ramirez, I., and Robert, M.Q. (2003). Isoproterenol increases active lipoprotein lipase in adipocyte medium and in rat plasma. *Biochimie* 85, 971-982.
- Baum, L., Wiebusch, H., and Pang, C.P. (2000). Roles for lipoprotein lipase in Alzheimer's disease: an association study. *Microscopy research and technique* 50, 291-296.
- Beigneux, A.P., Davies, B.S., Gin, P., Weinstein, M.M., Farber, E., Qiao, X., Peale, F., Bunting, S., Walzem, R.L., Wong, J.S., et al. (2007). Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 plays a critical role in the lipolytic processing of chylomicrons. *Cell metabolism* 5, 279-291.
- Beigneux, A.P., Weinstein, M.M., Davies, B.S., Gin, P., Bensadoun, A., Fong, L.G., and Young, S.G. (2009). GPIHBP1 and lipolysis: an update. *Current opinion in lipidology* 20, 211-216.
- Ben-Zeev, O., Doolittle, M.H., Davis, R.C., Elovson, J., and Schotz, M.C. (1992). Maturation of lipoprotein lipase. Expression of full catalytic activity requires glucose trimming but not translocation to the cis-Golgi compartment. *The Journal of biological chemistry* 267, 6219-6227.
- Ben-Zeev, O., Mao, H.Z., and Doolittle, M.H. (2002). Maturation of lipoprotein lipase in the endoplasmic reticulum. Concurrent formation of functional dimers and inactive aggregates. *The Journal of biological chemistry* 277, 10727-10738.
- Ben-Zeev, O., Stahnke, G., Liu, G., Davis, R.C., and Doolittle, M.H. (1994). Lipoprotein lipase and hepatic lipase: the role of asparagine-linked glycosylation in the expression of a functional enzyme. *Journal of lipid research* 35, 1511-1523.

- Bengtsson, G., and Olivecrona, T. (1982). Activation of lipoprotein lipase by apolipoprotein CII. Demonstration of an effect of the activator on the binding of the enzyme to milk-fat globules. *FEBS letters* 147, 183-187.
- Bengtsson-Olivecrona, G., and Olivecrona, T. (1985). Binding of active and inactive forms of lipoprotein lipase to heparin. Effects of pH. *The Biochemical journal* 226, 409-413.
- Bengtsson-Olivecrona, G., and Olivecrona, T. (1991). Phospholipase activity of milk lipoprotein lipase. *Methods in enzymology* 197, 345-356.
- Berg, B.N., Simms, H.S., and Everitt, A.V. (1963). Nutrition and longevity in the rat. V. Weaning weight, adult size, and onset of disease. *The Journal of nutrition* 80, 255-262.
- Bergo, M., Olivecrona, G., and Olivecrona, T. (1996a). Diurnal rhythms and effects of fasting and refeeding on rat adipose tissue lipoprotein lipase. *The American journal of physiology* 271, E1092-1097.
- Bergo, M., Olivecrona, G., and Olivecrona, T. (1996b). Forms of lipoprotein lipase in rat tissues: in adipose tissue the proportion of inactive lipase increases on fasting. *The Biochemical journal* 313 (Pt 3), 893-898.
- Bergo, M., Olivecrona, G., and Olivecrona, T. (1997). Regulation of adipose tissue lipoprotein lipase in young and old rats. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 21, 980-986.
- Bergo, M., Wu, G., Ruge, T., and Olivecrona, T. (2002). Down-regulation of adipose tissue lipoprotein lipase during fasting requires that a gene, separate from the lipase gene, is switched on. *The Journal of biological chemistry* 277, 11927-11932.
- Bertin, R., Triconnet, M., and Portet, R. (1985). Effects of cold acclimation on the activity of lipoprotein lipase in adipose tissues of genetically obese Zucker rats. *Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry* 81, 797-801.
- Bjorndal, B., Burri, L., Staalesen, V., Skorve, J., and Berge, R.K. (2011). Different adipose depots: their role in the development of metabolic syndrome and mitochondrial response to hypolipidemic agents. *Journal of obesity* 2011, 490650.
- Bouley, J., Chambon, C., and Picard, B. (2004). Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 4, 1811-1824.
- Braun, J.E., and Severson, D.L. (1992). Regulation of the synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase. *The Biochemical journal* 287 (Pt 2), 337-347.
- Burgaya, F., Peinado, J., Vilaro, S., Llobera, M., and Ramirez, I. (1989). Lipoprotein lipase activity in neonatal-rat liver cell types. *The Biochemical journal* 259, 159-166.
- Camps, L., Reina, M., Llobera, M., Vilaro, S., and Olivecrona, T. (1990). Lipoprotein lipase: cellular origin and functional distribution. *The American journal of physiology* 258, C673-681.
- Carneheim, C., Nedergaard, J., and Cannon, B. (1984). Beta-adrenergic stimulation of lipoprotein lipase in rat brown adipose tissue during acclimation to cold. *The American journal of physiology* 246, E327-333.

- Casanovas, A. (2009). Estudi de la lipoproteïna lipasa mitjançant eines proteòmiques. Possible participació de l'òxid nítric en la seva regulació. In Departament de Bioquímica i Biologia molecular (Barcelona: Universitat de Barcelona), p. 200.
- Casanovas, A., Carrascal, M., Abian, J., Lopez-Tejero, M.D., and Llobera, M. (2008). Application of proteomic tools to detect the nonspecificity of a polyclonal antibody against lipoprotein lipase. *Journal of proteome research* 7, 4173-4177.
- Casanovas, A., Carrascal, M., Abian, J., Lopez-Tejero, M.D., and Llobera, M. (2009a). Discovery of lipoprotein lipase pl isoforms and contributions to their characterization. *Journal of proteomics* 72, 1031-1039.
- Casanovas, A., Carrascal, M., Abian, J., Lopez-Tejero, M.D., and Llobera, M. (2009b). Lipoprotein lipase is nitrated in vivo after lipopolysaccharide challenge. *Free radical biology & medicine* 47, 1553-1560.
- Casanovas, A., Parramon, N., de la Cruz, F., Andres, O., Terencio, J., Lopez-Tejero, M.D., and Llobera, M. (2007). Retroperitoneal white adipose tissue lipoprotein lipase activity is rapidly down-regulated in response to acute stress. *Journal of lipid research* 48, 863-868.
- Cazes, A., Galaup, A., Chomel, C., Bignon, M., Brechot, N., Le Jan, S., Weber, H., Corvol, P., Muller, L., Germain, S., et al. (2006). Extracellular matrix-bound angiopoietin-like 4 inhibits endothelial cell adhesion, migration, and sprouting and alters actin cytoskeleton. *Circulation research* 99, 1207-1215.
- Chang, S.F., Reich, B., Brunzell, J.D., and Will, H. (1998). Detailed characterization of the binding site of the lipoprotein lipase-specific monoclonal antibody 5D2. *Journal of lipid research* 39, 2350-2359.
- Cheng, Y., and Hauton, D. (2008). Cold acclimation induces physiological cardiac hypertrophy and increases assimilation of triacylglycerol metabolism through lipoprotein lipase. *Biochimica et biophysica acta* 1781, 618-626.
- Cooper, A.D. (1997). Hepatic uptake of chylomicron remnants. *Journal of lipid research* 38, 2173-2192.
- Cupp, M., Bensadoun, A., and Melford, K. (1987). Heparin decreases the degradation rate of lipoprotein lipase in adipocytes. *The Journal of biological chemistry* 262, 6383-6388.
- Dallinga-Thie, G.M., Franssen, R., Mooij, H.L., Visser, M.E., Hassing, H.C., Peelman, F., Kastelein, J.J., Peterfy, M., and Nieuwdorp, M. (2010). The metabolism of triglyceride-rich lipoproteins revisited: new players, new insight. *Atherosclerosis* 211, 1-8.
- Dallinga-Thie, G.M., Kroon, J., Boren, J., and Chapman, M.J. (2016). Triglyceride-Rich Lipoproteins and Remnants: Targets for Therapy? *Current cardiology reports* 18, 67.
- Dallinga-Thie, G.M., van Tol, A., Hattori, H., van Vark-van der Zee, L.C., Jansen, H., Sijbrands, E.J., and group, D.s. (2006). Plasma apolipoprotein A5 and triglycerides in type 2 diabetes. *Diabetologia* 49, 1505-1511.
- Davies, B.S., Beigneux, A.P., Barnes, R.H., 2nd, Tu, Y., Gin, P., Weinstein, M.M., Nobumori, C., Nyren, R., Goldberg, I., Olivecrona, G., et al. (2010). GPIHBP1 is responsible for the entry of lipoprotein lipase into capillaries. *Cell metabolism* 12, 42-52.
- Davies, B.S., Goulbourne, C.N., Barnes, R.H., 2nd, Turlo, K.A., Gin, P., Vaughan, S., Vaux, D.J., Bensadoun, A., Beigneux, A.P., Fong, L.G., et al. (2012). Assessing mechanisms of GPIHBP1 and lipoprotein lipase movement across endothelial cells. *Journal of lipid research* 53, 2690-2697.

- Davies, B.S., Waki, H., Beigneux, A.P., Farber, E., Weinstein, M.M., Wilpitz, D.C., Tai, L.J., Evans, R.M., Fong, L.G., Tontonoz, P., et al. (2008). The expression of GPIHBP1, an endothelial cell binding site for lipoprotein lipase and chylomicrons, is induced by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Molecular endocrinology* 22, 2496-2504.
- de Jong, G., and van Eijk, H.G. (1988). Microheterogeneity of human serum transferrin: a biological phenomenon studied by isoelectric focusing in immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 9, 589-598.
- Deeb, S.S., and Peng, R.L. (1989). Structure of the human lipoprotein lipase gene. *Biochemistry* 28, 4131-4135.
- Deshaies, Y., Richard, D., and Arnold, J. (1986). Lipoprotein lipase in adipose tissues of exercise-trained, cold-acclimated rats. *The American journal of physiology* 251, E251-257.
- Doolittle, M.H., Ben-Zeev, O., Elovson, J., Martin, D., and Kirchgessner, T.G. (1990). The response of lipoprotein lipase to feeding and fasting. Evidence for posttranslational regulation. *The Journal of biological chemistry* 265, 4570-4577.
- Doolittle, M.H., Ehrhardt, N., and Peterfy, M. (2010). Lipase maturation factor 1: structure and role in lipase folding and assembly. *Current opinion in lipidology* 21, 198-203.
- Dugi, K.A., Dichek, H.L., Talley, G.D., Brewer, H.B., Jr., and Santamarina-Fojo, S. (1992). Human lipoprotein lipase: the loop covering the catalytic site is essential for interaction with lipid substrates. *The Journal of biological chemistry* 267, 25086-25091.
- Eckel, R.H., Prasad, J.E., Kern, P.A., and Marshall, S. (1984). Insulin regulation of lipoprotein lipase in cultured isolated rat adipocytes. *Endocrinology* 114, 1665-1671.
- Emmerich, J., Beg, O.U., Peterson, J., Previato, L., Brunzell, J.D., Brewer, H.B., Jr., and Santamarina-Fojo, S. (1992). Human lipoprotein lipase. Analysis of the catalytic triad by site-directed mutagenesis of Ser-132, Asp-156, and His-241. *The Journal of biological chemistry* 267, 4161-4165.
- Finnie, C.B.-J., K. S.; Laugesen, S.; Roepstorff, P.; Svensson, B. (2005). Differential appearance of isoforms and cultivar variation in protein temporal profiles revealed in the maturing barley grain proteome. *Plant Science* 170, 808-821.
- Franc, V., Yang, Y., and Heck, A.J. (2017). Proteoform Profile Mapping of the Human Serum Complement Component C9 Revealing Unexpected New Features of N-, O-, and C-Glycosylation. *Analytical chemistry* 89, 3483-3491.
- Franchin, C., Pivato, M., Rattazzi, M., Arrigoni, G., and Millionsi, R. (2014). OFFGEL fractionation of peptides: where really is your sample? *Journal of chromatography. A* 1355, 278-283.
- Galan, X., Llobera, M., and Ramirez, I. (1993). Lipoprotein lipase in developing rat tissues: differences between Wistar and Sprague-Dawley rats. *Biology of the neonate* 64, 295-303.
- Gil, G., Mao, P., Avula, B., Ali, Z., Chittiboyina, A.G., Khan, I.A., Walker, L.A., and Wang, D. (2017). Proteoform-Specific Protein Binding of Small Molecules in Complex Matrices. *ACS chemical biology* 12, 389-397.
- Gilbert, W. (1985). Genes-in-pieces revisited. *Science* 228, 823-824.

- Giralt, M., Martin, I., Vilaro, S., Villarroya, F., Mampel, T., Iglesias, R., and Vinas, O. (1990). Lipoprotein lipase mRNA expression in brown adipose tissue: translational and/or posttranslational events are involved in the modulation of enzyme activity. *Biochimica et biophysica acta* 1048, 270-273.
- Goldberg, I.J., Le, N.A., Ginsberg, H.N., Krauss, R.M., and Lindgren, F.T. (1988). Lipoprotein metabolism during acute inhibition of lipoprotein lipase in the cynomolgus monkey. *The Journal of clinical investigation* 81, 561-568.
- Goldberg, I.J., Paterniti, J.R., Jr., and Brown, W.V. (1983). Measurement of lipoprotein lipase and hepatic triacylglycerol lipase in post-heparin plasma of the cynomolgus monkey. *Biochimica et biophysica acta* 752, 172-177.
- Goldberg, I.J., Scheraldi, C.A., Yacoub, L.K., Saxena, U., and Bisgaier, C.L. (1990). Lipoprotein ApoC-II activation of lipoprotein lipase. Modulation by apolipoprotein A-IV. *The Journal of biological chemistry* 265, 4266-4272.
- Goncharov, N.V., Belinskaia, D.A., Razygraev, A.V., and Ukolov, A.I. (2015). [On the Enzymatic Activity of Albumin]. *Bioorganicheskaja khimiia* 41, 131-144.
- Gorg, A., Weiss, W., and Dunn, M.J. (2004). Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 4, 3665-3685.
- Gorski, J., and Stankiewicz-Choroszuca, B. (1982). The effect of hormones on lipoprotein lipase activity in skeletal muscles of the rat. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 14, 189-191.
- Goulbourne, C.N., Gin, P., Tatar, A., Nobumori, C., Hoenger, A., Jiang, H., Grovenor, C.R., Adeyo, O., Esko, J.D., Goldberg, I.J., et al. (2014). The GPIHBP1-LPL complex is responsible for the margination of triglyceride-rich lipoproteins in capillaries. *Cell metabolism* 19, 849-860.
- Greenwood, M.R. (1985). The relationship of enzyme activity to feeding behavior in rats: lipoprotein lipase as the metabolic gatekeeper. *International journal of obesity* 9 Suppl 1, 67-70.
- Grundy, S.M. (2016). Metabolic syndrome update. *Trends in cardiovascular medicine* 26, 364-373.
- Hahn, P.F. (1943). Abolishment of Alimentary Lipemia Following Injection of Heparin. *Science* 98, 19-20.
- Han, S.H., Nicholls, S.J., Sakuma, I., Zhao, D., and Koh, K.K. (2016). Hypertriglyceridemia and Cardiovascular Diseases: Revisited. *Korean circulation journal* 46, 135-144.
- Hata, A., Ridinger, D.N., Sutherland, S., Emi, M., Shuhua, Z., Myers, R.L., Ren, K., Cheng, T., Inoue, I., Wilson, D.E., et al. (1993). Binding of lipoprotein lipase to heparin. Identification of five critical residues in two distinct segments of the amino-terminal domain. *The Journal of biological chemistry* 268, 8447-8457.
- Hata, A., Ridinger, D.N., Sutherland, S.D., Emi, M., Kwong, L.K., Shuhua, J., Lubbers, A., Guy-Grand, B., Basdevant, A., Iverius, P.H., et al. (1992). Missense mutations in exon 5 of the human lipoprotein lipase gene. Inactivation correlates with loss of dimerization. *The Journal of biological chemistry* 267, 20132-20139.
- Helenius, A., and Aebi, M. (2001). Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 291, 2364-2369.

- Hietanen, E., and Greenwood, M.R. (1977). A comparison of lipoprotein lipase activity and adipocyte differentiation in growing male rats. *Journal of lipid research* 18, 480-490.
- Holmes, R.S., Vandeberg, J.L., and Cox, L.A. (2011). Comparative studies of vertebrate lipoprotein lipase: a key enzyme of very low density lipoprotein metabolism. *Comparative biochemistry and physiology. Part D, Genomics & proteomics* 6, 224-234.
- Hoogewerf, A.J., and Bensadoun, A. (1991). Occurrence of sulfate in an asparagine-linked complex oligosaccharide of chicken adipose lipoprotein lipase. *The Journal of biological chemistry* 266, 1048-1057.
- Hultin, M., Savonen, R., Chevreuril, O., and Olivecrona, T. (2013). Chylomicron metabolism in rats: kinetic modeling indicates that the particles remain at endothelial sites for minutes. *Journal of lipid research* 54, 2595-2605.
- Ioka, R.X., Kang, M.J., Kamiyama, S., Kim, D.H., Magoori, K., Kamataki, A., Ito, Y., Takei, Y.A., Sasaki, M., Suzuki, T., et al. (2003). Expression cloning and characterization of a novel glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein-binding protein, GPI-HBP1. *The Journal of biological chemistry* 278, 7344-7349.
- Jiang, L., He, L., and Fountoulakis, M. (2004). Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. *Journal of chromatography. A* 1023, 317-320.
- Jong, M.C., Hofker, M.H., and Havekes, L.M. (1999). Role of ApoCs in lipoprotein metabolism: functional differences between ApoC1, ApoC2, and ApoC3. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 19, 472-484.
- Julve, J., Martin-Campos, J.M., Escola-Gil, J.C., and Blanco-Vaca, F. (2016). Chylomicrons: Advances in biology, pathology, laboratory testing, and therapeutics. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 455, 134-148.
- Julve, J., Robert, M.Q., Llobera, M., and Peinado-Onsurbe, J. (1996). Hormonal regulation of lipoprotein lipase activity from 5-day-old rat hepatocytes. *Molecular and cellular endocrinology* 116, 97-104.
- Jungblut, P.R., Holzhutter, H.G., Apweiler, R., and Schluter, H. (2008). The speciation of the proteome. *Chemistry Central journal* 2, 16.
- Kampf, J.P., and Kleinfeld, A.M. (2007). Is membrane transport of FFA mediated by lipid, protein, or both? An unknown protein mediates free fatty acid transport across the adipocyte plasma membrane. *Physiology* 22, 7-14.
- Keen, C.L., Lonnerdal, B., Clegg, M., and Hurley, L.S. (1981). Developmental changes in composition of rat milk: trace elements, minerals, protein, carbohydrate and fat. *The Journal of nutrition* 111, 226-236.
- Keiper, T., Schneider, J.G., and Dugi, K.A. (2001). Novel site in lipoprotein lipase (LPL415;-438) essential for substrate interaction and dimer stability. *Journal of lipid research* 42, 1180-1186.
- Kersten, S. (2014). Physiological regulation of lipoprotein lipase. *Biochimica et biophysica acta* 1841, 919-933.
- Kersten, S., Lichtenstein, L., Steenbergen, E., Mudde, K., Hendriks, H.F., Hesselink, M.K., Schrauwen, P., and Muller, M. (2009). Caloric restriction and exercise increase plasma ANGPTL4 levels in humans via elevated free fatty acids. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 29, 969-974.

- Kim, S.J., Rhee, H.W., Park, H.J., Kim, H.Y., Kim, H.S., and Hong, J.I. (2013). Fluorescent probes designed for detecting human serum albumin on the basis of its pseudo-esterase activity. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 23, 2093-2097.
- Kirchgessner, T.G., Chuat, J.C., Heinzmann, C., Etienne, J., Guilhot, S., Svenson, K., Ameis, D., Pilon, C., d'Auriol, L., Andalibi, A., et al. (1989). Organization of the human lipoprotein lipase gene and evolution of the lipase gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 9647-9651.
- Kirchgessner, T.G., Svenson, K.L., Lusic, A.J., and Schotz, M.C. (1987). The sequence of cDNA encoding lipoprotein lipase. A member of a lipase gene family. *The Journal of biological chemistry* 262, 8463-8466.
- Kleinert, P., Kuster, T., Arnold, D., Jaeken, J., Heizmann, C.W., and Troxler, H. (2007). Effect of glycosylation on the protein pattern in 2-D-gel electrophoresis. *Proteomics* 7, 15-22.
- Klingenspor, M., Ebbinghaus, C., Hulshorst, G., Stohr, S., Spiegelhalter, F., Haas, K., and Heldmaier, G. (1996). Multiple regulatory steps are involved in the control of lipoprotein lipase activity in brown adipose tissue. *Journal of lipid research* 37, 1685-1695.
- Kobayashi, J., Inadera, H., Fujita, Y., Talley, G., Morisaki, N., Yoshida, S., Saito, Y., Fojo, S.S., and Brewer, H.B., Jr. (1994). A naturally occurring mutation at the second base of codon asparagine 43 in the proposed N-linked glycosylation site of human lipoprotein lipase: in vivo evidence that asparagine 43 is essential for catalysis and secretion. *Biochemical and biophysical research communications* 205, 506-515.
- Kobayashi, J., and Mabuchi, H. (2015). Lipoprotein lipase and atherosclerosis. *Annals of clinical biochemistry* 52, 632-637.
- Kobayashi, Y., Nakajima, T., and Inoue, I. (2002). Molecular modeling of the dimeric structure of human lipoprotein lipase and functional studies of the carboxyl-terminal domain. *European journal of biochemistry* 269, 4701-4710.
- Korn, E.D. (1955). Clearing factor, a heparin-activated lipoprotein lipase. I. Isolation and characterization of the enzyme from normal rat heart. *The Journal of biological chemistry* 215, 1-14.
- Korte, R., Happe, J., Brummer, I., and Brockmeyer, J. (2017). Structural Characterization of the Allergenic 2S Albumin Cor a 14: Comparing Proteoform Patterns across Hazelnut Cultivars. *Journal of proteome research* 16, 988-998.
- Kroupa, O., Vorrso, E., Stienstra, R., Mattijssen, F., Nilsson, S.K., Sukonina, V., Kersten, S., Olivecrona, G., and Olivecrona, T. (2012). Linking nutritional regulation of Angptl4, Gpihbp1, and Lmf1 to lipoprotein lipase activity in rodent adipose tissue. *BMC physiology* 12, 13.
- Langsford, M.L., Gilkes, N.R., Singh, B., Moser, B., Miller, R.C., Jr., Warren, R.A., and Kilburn, D.G. (1987). Glycosylation of bacterial cellulases prevents proteolytic cleavage between functional domains. *FEBS letters* 225, 163-167.
- Larsson, M., Vorrso, E., Talmud, P., Lookene, A., and Olivecrona, G. (2013). Apolipoproteins C-I and C-III inhibit lipoprotein lipase activity by displacement of the enzyme from lipid droplets. *The Journal of biological chemistry* 288, 33997-34008.
- Levak-Frank, S., Hofmann, W., Weinstock, P.H., Radner, H., Sattler, W., Breslow, J.L., and Zechner, R. (1999). Induced mutant mouse lines that express lipoprotein lipase in cardiac muscle, but not in skeletal muscle and adipose tissue, have normal plasma

- triglyceride and high-density lipoprotein-cholesterol levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 3165-3170.
- Levak-Frank, S., Weinstock, P.H., Hayek, T., Verdery, R., Hofmann, W., Ramakrishnan, R., Sattler, W., Breslow, J.L., and Zechner, R. (1997). Induced mutant mice expressing lipoprotein lipase exclusively in muscle have subnormal triglycerides yet reduced high density lipoprotein cholesterol levels in plasma. *The Journal of biological chemistry* 272, 17182-17190.
- Lin, S., Wein, S., Gonzales-Cope, M., Otte, G.L., Yuan, Z.F., Afjehi-Sadat, L., Maile, T., Berger, S.L., Rush, J., Lill, J.R., et al. (2014). Stable-isotope-labeled histone peptide library for histone post-translational modification and variant quantification by mass spectrometry. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 13, 2450-2466.
- Llado, I., Pons, A., and Palou, A. (1999). Effects of fasting on lipoprotein lipase activity in different depots of white and brown adipose tissues in diet-induced overweight rats. *The Journal of nutritional biochemistry* 10, 609-614.
- Llobera, M., Montes, A., and Herrera, E. (1979). Lipoprotein lipase activity in liver of the rat fetus. *Biochemical and biophysical research communications* 91, 272-277.
- Lookene, A., Chevreuril, O., Ostergaard, P., and Olivecrona, G. (1996). Interaction of lipoprotein lipase with heparin fragments and with heparan sulfate: stoichiometry, stabilization, and kinetics. *Biochemistry* 35, 12155-12163.
- Lutz, E.P., Merkel, M., Kako, Y., Melford, K., Radner, H., Breslow, J.L., Bensadoun, A., and Goldberg, I.J. (2001). Heparin-binding defective lipoprotein lipase is unstable and causes abnormalities in lipid delivery to tissues. *The Journal of clinical investigation* 107, 1183-1192.
- Magdeldin, S., Yamamoto, K., Yoshida, Y., Xu, B., Zhang, Y., Fujinaka, H., Yaoita, E., Yates, J.R., 3rd, and Yamamoto, T. (2014). Deep proteome mapping of mouse kidney based on OFFGel prefractionation reveals remarkable protein post-translational modifications. *Journal of proteome research* 13, 1636-1646.
- Makoveichuk, E., Sukonina, V., Kroupa, O., Thulin, P., Ehrenborg, E., Olivecrona, T., and Olivecrona, G. (2012). Inactivation of lipoprotein lipase occurs on the surface of THP-1 macrophages where oligomers of angiopoietin-like protein 4 are formed. *Biochemical and biophysical research communications* 425, 138-143.
- Malaney, P., Uversky, V.N., and Dave, V. (2017). PTEN proteoforms in biology and disease. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*.
- Mandard, S., Zandbergen, F., van Straten, E., Wahli, W., Kuipers, F., Muller, M., and Kersten, S. (2006). The fasting-induced adipose factor/angiopoietin-like protein 4 is physically associated with lipoproteins and governs plasma lipid levels and adiposity. *The Journal of biological chemistry* 281, 934-944.
- Mann, M., and Jensen, O.N. (2003). Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nature biotechnology* 21, 255-261.
- Mariam, J., Sivakami, S., Kothari, D.C., and Dongre, P.M. (2014). Bioactivity of albumins bound to silver nanoparticles. *The protein journal* 33, 258-266.
- Marko-Varga, G. (2004). Proteomics principles and challenges. *Pure Appl. Chem.* 76, 9.
- Marston, S.B., and Redwood, C.S. (2003). Modulation of thin filament activation by breakdown or isoform switching of thin filament proteins: physiological and pathological implications. *Circulation research* 93, 1170-1178.

- Martin-Bernabe, A., Cortes, R., Lehmann, S.G., Seve, M., Cascante, M., and Bourgoin-Voillard, S. (2014). Quantitative proteomic approach to understand metabolic adaptation in non-small cell lung cancer. *Journal of proteome research* 13, 4695-4704.
- Mead, J.R., Irvine, S.A., and Ramji, D.P. (2002). Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *Journal of molecular medicine* 80, 753-769.
- Medzihradszky, K.F. (2008). Characterization of site-specific N-glycosylation. *Methods in molecular biology* 446, 293-316.
- Merkel, M., Loeffler, B., Kluger, M., Fabig, N., Geppert, G., Pennacchio, L.A., Laatsch, A., and Heeren, J. (2005). Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase. *The Journal of biological chemistry* 280, 21553-21560.
- Michel, P.E., Reymond, F., Arnaud, I.L., Josserand, J., Girault, H.H., and Rossier, J.S. (2003). Protein fractionation in a multicompartiment device using Off-Gel isoelectric focusing. *Electrophoresis* 24, 3-11.
- Morak, M., Schmidinger, H., Krempl, P., Rechberger, G., Kollroser, M., Birner-Gruenberger, R., and Hermetter, A. (2009). Differential activity-based gel electrophoresis for comparative analysis of lipolytic and esterolytic activities. *Journal of lipid research* 50, 1281-1292.
- Moreda-Pineiro, A., Garcia-Otero, N., and Bermejo-Barrera, P. (2014). A review on preparative and semi-preparative offgel electrophoresis for multidimensional protein/peptide assessment. *Analytica chimica acta* 836, 1-17.
- Murphy, S., Dowling, P., and Ohlendieck, K. (2016). Comparative Skeletal Muscle Proteomics Using Two-Dimensional Gel Electrophoresis. *Proteomes* 4.
- Mutero, A., and Fournier, D. (1992). Post-translational modifications of *Drosophila* acetylcholinesterase. In vitro mutagenesis and expression in *Xenopus* oocytes. *The Journal of biological chemistry* 267, 1695-1700.
- Nakajima, K., Nakano, T., Tokita, Y., Nagamine, T., Inazu, A., Kobayashi, J., Mabuchi, H., Stanhope, K.L., Havel, P.J., Okazaki, M., et al. (2011). Postprandial lipoprotein metabolism: VLDL vs chylomicrons. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 412, 1306-1318.
- Natale, M., Bonino, D., Consoli, P., Alberio, T., Ravid, R.G., Fasano, M., and Bucci, E.M. (2010). A meta-analysis of two-dimensional electrophoresis pattern of the Parkinson's disease-related protein DJ-1. *Bioinformatics* 26, 946-952.
- Nicholas, K.R., and Hartmann, P.E. (1991). Milk secretion in the rat: progressive changes in milk composition during lactation and weaning and the effect of diet. *Comparative biochemistry and physiology. A, Comparative physiology* 98, 535-542.
- Nierman, M.C., Rip, J., Twisk, J., Meulenberg, J.J., Kastelein, J.J., Stroes, E.S., and Kuivenhoven, J.A. (2005). Gene therapy for genetic lipoprotein lipase deficiency: from promise to practice. *The Netherlands journal of medicine* 63, 14-19.
- Nilsson, S.K., Anderson, F., Ericsson, M., Larsson, M., Makoveichuk, E., Lookene, A., Heeren, J., and Olivecrona, G. (2012). Triacylglycerol-rich lipoproteins protect lipoprotein lipase from inactivation by ANGPTL3 and ANGPTL4. *Biochimica et biophysica acta* 1821, 1370-1378.

- Nilsson, S.K., Heeren, J., Olivecrona, G., and Merkel, M. (2011). Apolipoprotein A-V; a potent triglyceride reducer. *Atherosclerosis* 219, 15-21.
- Nishida, H. (2015). Relationship between chromosomal GC content and isoelectric points of histones in fungi. *The Journal of general and applied microbiology* 61, 24-26.
- Norris, E.L., Headlam, M.J., Dave, K.A., Smith, D.D., Bukreyev, A., Singh, T., Jayakody, B.A., Chappell, K.J., Collins, P.L., and Gorman, J.J. (2016). Proteoform-Specific Insights into Cellular Proteome Regulation. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 15, 3297-3320.
- Nykjaer, A., Nielsen, M., Lookene, A., Meyer, N., Roigaard, H., Etzerodt, M., Beisiegel, U., Olivecrona, G., and Gliemann, J. (1994). A carboxyl-terminal fragment of lipoprotein lipase binds to the low density lipoprotein receptor-related protein and inhibits lipase-mediated uptake of lipoprotein in cells. *The Journal of biological chemistry* 269, 31747-31755.
- Olafsen, T., Young, S.G., Davies, B.S., Beigneux, A.P., Kenanova, V.E., Voss, C., Young, G., Wong, K.P., Barnes, R.H., 2nd, Tu, Y., et al. (2010). Unexpected expression pattern for glycosylphosphatidylinositol-anchored HDL-binding protein 1 (GPIHBP1) in mouse tissues revealed by positron emission tomography scanning. *The Journal of biological chemistry* 285, 39239-39248.
- Olivecrona, G. (2016). Role of lipoprotein lipase in lipid metabolism. *Current opinion in lipidology* 27, 233-241.
- Olivecrona, G., and Olivecrona, T. (2010). Triglyceride lipases and atherosclerosis. *Current opinion in lipidology* 21, 409-415.
- Oliveira, B.M., Coorsen, J.R., and Martins-de-Souza, D. (2014). 2DE: the phoenix of proteomics. *Journal of proteomics* 104, 140-150.
- Orban, Z., Remaley, A.T., Sampson, M., Trajanoski, Z., and Chrousos, G.P. (1999). The differential effect of food intake and beta-adrenergic stimulation on adipose-derived hormones and cytokines in man. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 84, 2126-2133.
- Osborne, J.C., Jr., Bengtsson-Olivecrona, G., Lee, N.S., and Olivecrona, T. (1985). Studies on inactivation of lipoprotein lipase: role of the dimer to monomer dissociation. *Biochemistry* 24, 5606-5611.
- Pagel, O., Loroch, S., Sickmann, A., and Zahedi, R.P. (2015). Current strategies and findings in clinically relevant post-translational modification-specific proteomics. *Expert review of proteomics* 12, 235-253.
- Park, J.W., Oh, M.S., Yang, J.Y., Park, B.H., Rho, H.W., Lim, S.N., Jhee, E.C., and Kim, H.R. (1995). Glycosylation, dimerization, and heparin affinity of lipoprotein lipase in 3T3-L1 adipocytes. *Biochimica et biophysica acta* 1254, 45-50.
- Parkin, S.M., Speake, B.K., and Robinson, D.S. (1982). Purification and characterization of rat adipose tissue lipoprotein lipase. *The Biochemical journal* 207, 485-495.
- Pedersen, M.E., Cohen, M., and Schotz, M.C. (1983). Immunocytochemical localization of the functional fraction of lipoprotein lipase in the perfused heart. *Journal of lipid research* 24, 512-521.
- Peinado-Onsurbe, J., Staels, B., Deeb, S., Ramirez, I., Llobera, M., and Auwerx, J. (1992). Neonatal extinction of liver lipoprotein lipase expression. *Biochimica et biophysica acta* 1131, 281-286.

- Peng Y, A.-G.S., Yu D, Ge Y. (2014). Top-down mass spectrometry of cardiac myofilament proteins in health and disease. *Proteomics Clin Appl. Aug;8(7-8)*, 554-568.
- Pequignot-Planche, E., De Gasquet, P., Boulange, A., and Tonnu, N.T. (1977). Lipoprotein lipase activity at onset of development of white adipose tissue in newborn rats. *The Biochemical journal* 162, 461-463.
- Peterfy, M. (2012). Lipase maturation factor 1: a lipase chaperone involved in lipid metabolism. *Biochimica et biophysica acta* 1821, 790-794.
- Peterfy, M., Ben-Zeev, O., Mao, H.Z., Weissglas-Volkov, D., Aouizerat, B.E., Pullinger, C.R., Frost, P.H., Kane, J.P., Malloy, M.J., Reue, K., et al. (2007). Mutations in LMF1 cause combined lipase deficiency and severe hypertriglyceridemia. *Nature genetics* 39, 1483-1487.
- Peterson, J., Fujimoto, W.Y., and Brunzell, J.D. (1992). Human lipoprotein lipase: relationship of activity, heparin affinity, and conformation as studied with monoclonal antibodies. *Journal of lipid research* 33, 1165-1170.
- Picard, F., Kapur, S., Perreault, M., Marette, A., and Deshaies, Y. (2001). Nitric oxide mediates endotoxin-induced hypertriglyceridemia through its action on skeletal muscle lipoprotein lipase. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15, 1828-1830.
- Previato, L., Guardamagna, O., Dugi, K.A., Ronan, R., Talley, G.D., Santamarina-Fojo, S., and Brewer, H.B., Jr. (1994). A novel missense mutation in the C-terminal domain of lipoprotein lipase (Glu410-->Val) leads to enzyme inactivation and familial chylomicronemia. *Journal of lipid research* 35, 1552-1560.
- Quig, D.W., Layman, D.K., Bechtel, P.J., and Hackler, L.R. (1983). The influence of starvation and refeeding on the lipoprotein lipase activity of skeletal muscle and adipose tissue of lean and obese Zucker rats. *The Journal of nutrition* 113, 1150-1156.
- Raisonnier, A., Etienne, J., Arnault, F., Brault, D., Noe, L., Chuat, J.C., and Galibert, F. (1995). Comparison of the cDNA and amino acid sequences of lipoprotein lipase in eight species. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* 111, 385-398.
- Rajalingam, D., Loftis, C., Xu, J.J., and Kumar, T.K. (2009). Trichloroacetic acid-induced protein precipitation involves the reversible association of a stable partially structured intermediate. *Protein science : a publication of the Protein Society* 18, 980-993.
- Raju, T.S., and Scallon, B.J. (2006). Glycosylation in the Fc domain of IgG increases resistance to proteolytic cleavage by papain. *Biochemical and biophysical research communications* 341, 797-803.
- Ramirez, I., Kryski, A.J., Ben-Zeev, O., Schotz, M.C., and Severson, D.L. (1985). Characterization of triacylglycerol hydrolase activities in isolated myocardial cells from rat heart. *The Biochemical journal* 232, 229-236.
- Reina, M., Vilaro, S., Ramirez, I., and Llobera, M. (1987). Characterization of lipoprotein lipase activity in the newborn rat liver. *Biology of the neonate* 51, 45-52.
- Ricart-Jane, D. (2003). Efecte de l'estrès en la rata sobre la lipoproteïna lipasa. Possible implicació de l'òxid níric en la regulació d'aquest enzim en el teixit adipós blanc. In *Departament de Bioquímica i Biologia molecular (Barcelona: Universitat de Barcelona)*.

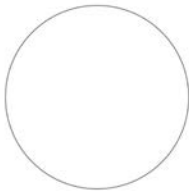
- Ricart-Jane, D., Casanovas, A., Jane, N., Gonzalez, M.A., Buira-Morell, I., Ribera, J., Llobera, M., and Lopez-Tejero, M.D. (2008). Nitric oxide and the release of lipoprotein lipase from white adipose tissue. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 22, 525-530.
- Ricart-Jane, D., Cejudo-Martin, P., Peinado-Onsurbe, J., Lopez-Tejero, M.D., and Llobera, M. (2005). Changes in lipoprotein lipase modulate tissue energy supply during stress. *Journal of applied physiology* 99, 1343-1351.
- Rodríguez-Piñeiro, A.M., Álvarez-Chaver, P., Martínez-Zorzano, V.S., Rodríguez-Berrocal, F.J., and Páez de la Cadena, M. (2007). Relevance of protein isoforms in proteomic studies. *Current Proteomics* 4, 18.
- Ros, A., Faupel, M., Mees, H., Oostrum, J., Ferrigno, R., Reymond, F., Michel, P., Rossier, J.S., and Girault, H.H. (2002). Protein purification by Off-Gel electrophoresis. *Proteomics* 2, 151-156.
- Roudeau, S., Chevreux, S., Carmona, A., and Ortega, R. (2015). Reduced net charge and heterogeneity of pl isoforms in familial amyotrophic lateral sclerosis mutants of copper/zinc superoxide dismutase. *Electrophoresis* 36, 2482-2488.
- Ruge, T., Bergo, M., Hultin, M., Olivecrona, G., and Olivecrona, T. (2000). Nutritional regulation of binding sites for lipoprotein lipase in rat heart. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 278, E211-218.
- Ruge, T., Sukonina, V., Myrnas, T., Lundgren, M., Eriksson, J.W., and Olivecrona, G. (2006). Lipoprotein lipase activity/mass ratio is higher in omental than in subcutaneous adipose tissue. *European journal of clinical investigation* 36, 16-21.
- Ruge, T., Svensson, A., Eriksson, J.W., Olivecrona, T., and Olivecrona, G. (2001). Food deprivation increases post-heparin lipoprotein lipase activity in humans. *European journal of clinical investigation* 31, 1040-1047.
- Ruge, T., Wu, G., Olivecrona, T., and Olivecrona, G. (2004). Nutritional regulation of lipoprotein lipase in mice. *The international journal of biochemistry & cell biology* 36, 320-329.
- Sabugal, R., Robert, M.Q., Julve, J., Auwerx, J., Llobera, M., and Peinado-Onsurbe, J. (1996). Hepatic regeneration induces changes in lipoprotein lipase activity in several tissues and its re-expression in the liver. *The Biochemical journal* 318 (Pt 2), 597-602.
- Sagoo, G.S., Tatt, I., Salanti, G., Butterworth, A.S., Sarwar, N., van Maarle, M., Jukema, J.W., Wiman, B., Kastelein, J.J., Bennet, A.M., et al. (2008). Seven lipoprotein lipase gene polymorphisms, lipid fractions, and coronary disease: a HuGE association review and meta-analysis. *American journal of epidemiology* 168, 1233-1246.
- Santamarina-Fojo, S., and Brewer, H.B., Jr. (1994). Lipoprotein lipase: structure, function and mechanism of action. *International journal of clinical & laboratory research* 24, 143-147.
- Sato, K., Akiba, Y., and Horiguchi, M. (1997). Species differences between chickens and rats in chemical properties of adipose tissue lipoprotein lipase. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Physiology* 118, 855-858.
- Schluter, H., Apweiler, R., Holzhutter, H.G., and Jungblut, P.R. (2009). Finding one's way in proteomics: a protein species nomenclature. *Chemistry Central journal* 3, 11.

- Schoonjans, K., Peinado-Onsurbe, J., Fruchart, J.C., Tailleux, A., Fievet, C., and Auwerx, J. (1999). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors reduce serum triglyceride levels through modulation of apolipoprotein C-III and lipoprotein lipase. *FEBS letters* 452, 160-164.
- Scow, R.O., and Egelrud, T. (1976). Hydrolysis of chylomicron phosphatidylcholine in vitro by lipoprotein lipase, phospholipase A2 and phospholipase C. *Biochimica et biophysica acta* 431, 538-549.
- Seip, R.L., Angelopoulos, T.J., and Semenkovich, C.F. (1995). Exercise induces human lipoprotein lipase gene expression in skeletal muscle but not adipose tissue. *The American journal of physiology* 268, E229-236.
- Semb, H., and Olivecrona, T. (1986). Lipoprotein lipase in guinea pig tissues: molecular size and rates of synthesis. *Biochimica et biophysica acta* 878, 330-337.
- Semenkovich, C.F., Chen, S.H., Wims, M., Luo, C.C., Li, W.H., and Chan, L. (1989). Lipoprotein lipase and hepatic lipase mRNA tissue specific expression, developmental regulation, and evolution. *Journal of lipid research* 30, 423-431.
- Senda, M., Oka, K., Brown, W.V., Qasba, P.K., and Furuichi, Y. (1987). Molecular cloning and sequence of a cDNA coding for bovine lipoprotein lipase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 4369-4373.
- Sha, H., Sun, S., Francisco, A.B., Ehrhardt, N., Xue, Z., Liu, L., Lawrence, P., Mattijssen, F., Guber, R.D., Panhwar, M.S., et al. (2014). The ER-Associated Degradation Adaptor Protein Sel1L Regulates LPL Secretion and Lipid Metabolism. *Cell metabolism* 20, 458-470.
- Sharma, C., Srinivasan, S.R., Radhakrishnamurthy, B., and Berenson, G.S. (1986). Effect of dietary carbohydrate type on lipoprotein lipase, hepatic lipase, and lecithin:cholesterol acyltransferase activities in cynomolgus monkeys. *Biochemical medicine and metabolic biology* 36, 51-59.
- Simsolo, R.B., Ong, J.M., and Kern, P.A. (1992). Characterization of lipoprotein lipase activity, secretion, and degradation at different sites of post-translational processing in primary cultures of rat adipocytes. *Journal of lipid research* 33, 1777-1784.
- Simsolo, R.B., Ong, J.M., and Kern, P.A. (1993). The regulation of adipose tissue and muscle lipoprotein lipase in runners by detraining. *The Journal of clinical investigation* 92, 2124-2130.
- Smith, L.M., Kelleher, N.L., and Consortium for Top Down, P. (2013). Proteoform: a single term describing protein complexity. *Nature methods* 10, 186-187.
- Sonnenburg, W.K., Yu, D., Lee, E.C., Xiong, W., Gololobov, G., Key, B., Gay, J., Wilganowski, N., Hu, Y., Zhao, S., et al. (2009). GPIHBP1 stabilizes lipoprotein lipase and prevents its inhibition by angiotensin-like 3 and angiotensin-like 4. *Journal of lipid research* 50, 2421-2429.
- Soteriou, A., and Cryer, A. (1993). Comparison of the purification of lipoprotein lipase from various rat tissues. *Biochemical Society transactions* 21, 134S.
- Sukonina, V., Lookene, A., Olivecrona, T., and Olivecrona, G. (2006). Angiotensin-like protein 4 converts lipoprotein lipase to inactive monomers and modulates lipase activity in adipose tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 17450-17455.
- Taylor, M.E. (2011). *Introduction to glycobiology*.

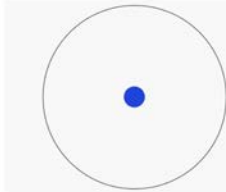
- Tipton, J.D., Tran, J.C., Catherman, A.D., Ahlf, D.R., Durbin, K.R., and Kelleher, N.L. (2011). Analysis of intact protein isoforms by mass spectrometry. *The Journal of biological chemistry* 286, 25451-25458.
- Través, C., García-Arumí, E., López-Hellín, J., Baena-Fustegueras, J.A., and Lopez-Tejero, M.D. (2010). Concomitant apolipoprotein A-IV and citrulline plasma changes during short-term parenteral nutrition in surgical patients. *e-SPEN, the European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism* 5, 6.
- Trayhurn, P., Duncan, J.S., and Rayner, D.V. (1995). Acute cold-induced suppression of ob (obese) gene expression in white adipose tissue of mice: mediation by the sympathetic system. *The Biochemical journal* 311 (Pt 3), 729-733.
- Unlu, M., Morgan, M.E., and Minden, J.S. (1997). Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 18, 2071-2077.
- van Tilbeurgh, H., Roussel, A., Lalouel, J.M., and Cambillau, C. (1994). Lipoprotein lipase. Molecular model based on the pancreatic lipase x-ray structure: consequences for heparin binding and catalysis. *The Journal of biological chemistry* 269, 4626-4633.
- Vannier, C., and Ailhaud, G. (1989). Biosynthesis of lipoprotein lipase in cultured mouse adipocytes. II. Processing, subunit assembly, and intracellular transport. *The Journal of biological chemistry* 264, 13206-13216.
- Vercauteren, F.G., Arckens, L., and Quirion, R. (2007). Applications and current challenges of proteomic approaches, focusing on two-dimensional electrophoresis. *Amino acids* 33, 405-414.
- Vilaro, S., Llobera, M., Bengtsson-Olivecrona, G., and Olivecrona, T. (1988a). Lipoprotein lipase uptake by the liver: localization, turnover, and metabolic role. *The American journal of physiology* 254, G711-722.
- Vilaro, S., Llobera, M., Bengtsson-Olivecrona, G., and Olivecrona, T. (1988b). Synthesis of lipoprotein lipase in the liver of newborn rats and localization of the enzyme by immunofluorescence. *The Biochemical journal* 249, 549-556.
- Vilella, E., Joven, J., Fernandez, M., Vilaro, S., Brunzell, J.D., Olivecrona, T., and Bengtsson-Olivecrona, G. (1993). Lipoprotein lipase in human plasma is mainly inactive and associated with cholesterol-rich lipoproteins. *Journal of lipid research* 34, 1555-1564.
- Weinstock, P.H., Levak-Frank, S., Hudgins, L.C., Radner, H., Friedman, J.M., Zechner, R., and Breslow, J.L. (1997). Lipoprotein lipase controls fatty acid entry into adipose tissue, but fat mass is preserved by endogenous synthesis in mice deficient in adipose tissue lipoprotein lipase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 10261-10266.
- Williams, S.E., Inoue, I., Tran, H., Fry, G.L., Pladet, M.W., Iverius, P.H., Lalouel, J.M., Chappell, D.A., and Strickland, D.K. (1994). The carboxyl-terminal domain of lipoprotein lipase binds to the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor (LRP) and mediates binding of normal very low density lipoproteins to LRP. *The Journal of biological chemistry* 269, 8653-8658.
- Witze, E.S., Old, W.M., Resing, K.A., and Ahn, N.G. (2007). Mapping protein post-translational modifications with mass spectrometry. *Nature methods* 4, 798-806.
- Wong, H., Davis, R.C., Nikazy, J., Seebart, K.E., and Schotz, M.C. (1991). Domain exchange: characterization of a chimeric lipase of hepatic lipase and lipoprotein lipase.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *88*, 11290-11294.
- Wong, H., and Schotz, M.C. (2002). The lipase gene family. *Journal of lipid research* *43*, 993-999.
- Wong, H., Yang, D., Hill, J.S., Davis, R.C., Nikazy, J., and Schotz, M.C. (1997). A molecular biology-based approach to resolve the subunit orientation of lipoprotein lipase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *94*, 5594-5598.
- Wu, G., Brouckaert, P., and Olivecrona, T. (2004). Rapid downregulation of adipose tissue lipoprotein lipase activity on food deprivation: evidence that TNF-alpha is involved. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* *286*, E711-717.
- Wu, G., Olivecrona, G., and Olivecrona, T. (2003). The distribution of lipoprotein lipase in rat adipose tissue. Changes with nutritional state engage the extracellular enzyme. *The Journal of biological chemistry* *278*, 11925-11930.
- Yang, C.Y., Gu, Z.W., Yang, H.X., Rohde, M.F., Gotto, A.M., Jr., and Pownall, H.J. (1989). Structure of bovine milk lipoprotein lipase. *The Journal of biological chemistry* *264*, 16822-16827.
- Yoshida, K., Shimizugawa, T., Ono, M., and Furukawa, H. (2002). Angiotensin-like protein 4 is a potent hyperlipidemia-inducing factor in mice and inhibitor of lipoprotein lipase. *Journal of lipid research* *43*, 1770-1772.
- Zabrouskov, V., Ge, Y., Schwartz, J., and Walker, J.W. (2008). Unraveling molecular complexity of phosphorylated human cardiac troponin I by top down electron capture dissociation/electron transfer dissociation mass spectrometry. *Molecular & cellular proteomics : MCP* *7*, 1838-1849.
- Zechner, R., Strauss, J., Frank, S., Wagner, E., Hofmann, W., Kratky, D., Hiden, M., and Levak-Frank, S. (2000). The role of lipoprotein lipase in adipose tissue development and metabolism. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* *24 Suppl 4*, S53-56.

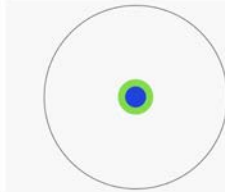
Imagine a circle that contains all of human knowledge:



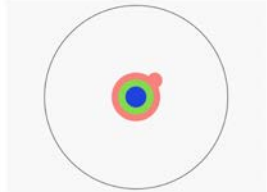
By the time you finish elementary school, you know a little:



By the time you finish high school, you know a bit more:



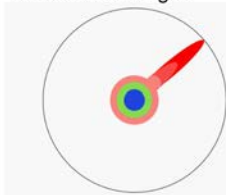
With a bachelor's degree, you gain a specialty:



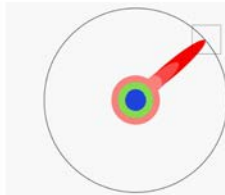
A master's degree deepens that specialty:



Reading research papers takes you to the edge of human knowledge:



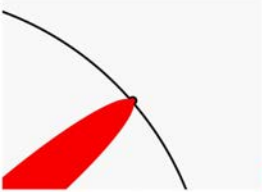
Once you're at the boundary, you focus:



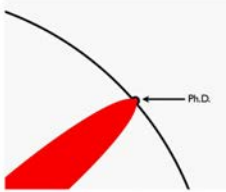
You push at the boundary for a few years:



Until one day, the boundary gives way:



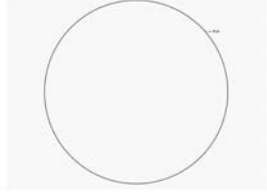
And, that dent you've made is called a Ph.D.:



Of course, the world looks different to you now:



So, don't forget the bigger picture:



Keep pushing.