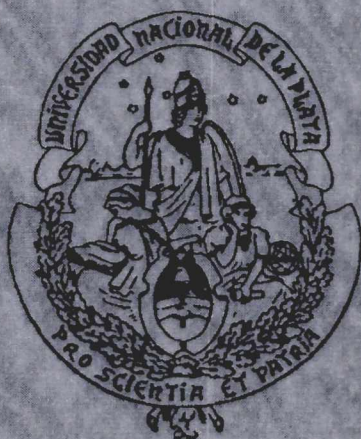


# Glicerol-3-fosfato aciltransferasa mitocondrial: aspectos estructurales que determinan su actividad enzimática



Biblioteca Central  
Fac. Cs. Exactas  
U.N.L.P.



Tesis Doctoral  
Universidad Nacional de La Plata  
Facultad de Ciencias Exactas  
Departamento de Ciencias  
Biológicas  
2007

TESIS  
No 1163

Tesista: Magalí Pellon Maison  
Directora: María de Rosario González-Baró

DONACION

Fecha 02-02-09

Int. E. Inv.

B. 58606



# ÍNDICE

## Capítulo 1: Marco teórico

- 1.1 ¿Por qué estudiar la síntesis de triglicéridos? Pág. 1-2
- 1.2 Vías de síntesis de triglicéridos en mamíferos Pág. 3-7
  - 1.2.1 Síntesis *de novo* a partir de *sn*-glicerol-3-fosfato (G3P) Pág. 3
  - 1.2.2 Vía del monoacilglicerol Pág. 7
  - 1.2.3 Transacilación acilCoA independiente Pág. 7
- 1.3 Enzimas que catalizan la síntesis de novo de glicerolípidos Pág. 8-15
  - 1.3.1 Activación de los ácidos grasos: acilCoA sintetasas de cadena larga (ACSL) Pág. 9
  - 1.3.2 Síntesis de 1-acil-*sn*-glicerol-3-fosfato (ácido lisofosfatídico, ALF) Pág. 11
  - 1.3.3 Síntesis de ácido fosfatídico (AF) Pág. 12
  - 1.3.4 Síntesis de diacilglicerol (DG) Pág. 14
  - 1.3.5 Síntesis de triacilgliceroles Pág. 15
- 1.4 Glicerol-3-fosfato aciltransferasa-1: una enzima clave en la regulación de la síntesis de triglicéridos hepáticos Pág. 15-18
  - 1.4.1 Regulación transcripcional de GPAT1 Pág. 15
  - 1.4.2 Regulación postranscripcional de GPAT1 Pág. 17

## Capítulo 2: Objetivos generales

Pág. 19

## Capítulo 3: Metodología

- 3.1 Modelos experimentales Pág. 20-22
  - 3.1.1 *Rattus norvegicus* Pág. 20
  - 3.1.2 *Macrobrachium borellii* Pág. 20

<b>3.1.3</b>	Células en cultivo	Pág. 21
<b>3.2</b>	Fraccionamientos subcelulares	Pág. 22-26
<b>3.2.1</b>	Obtención de fracciones subcelulares de hígado de rata	Pág. 22
3.2.1.1	Obtención de homogenato, mitocondrias crudas y microsomas	
3.2.1.2	Obtención de mitocondrias puras, membranas asociadas a mitocondria y fracción MAV	
<b>3.2.3</b>	Obtención de la fracción de membranas totales de células en cultivo	Pág. 25
<b>3.3</b>	Fraccionamiento submitocondrial	Pág. 26
<b>3.4</b>	Determinación de actividades enzimáticas	Pág. 27-
<b>3.4.1</b>	Medición de la actividad glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPA)	Pág. 27
<b>3.4.2</b>	Medición de la actividad de enzimas marcadoras	Pág. 28
3.4.2.1	Arilesterasa	
3.4.2.2	Citocromo c oxidasa	
3.4.2.3	Monoaminoxidasa	
3.4.2.4	Fosfatasa alcalina	
<b>3.5</b>	Detección de proteínas por la técnica de Western blot	Pág. 30
<b>3.5.1</b>	Anticuerpos utilizados	Pág. 30
3.5.1.1	Anticuerpos primarios	
3.5.1.1.1	Anticuerpo anti-GPAT1	
3.5.1.1.2	Anticuerpo anti-VDAC	
3.5.1.1.3	Anticuerpo anti-GRP78	
3.5.1.1.4	Anticuerpo anti-PEMT2	
3.5.1.1.5	Anticuerpo anti-FLAG	
3.5.1.1.6	Anticuerpo anti-HA	
3.5.1.2	Anticuerpos secundarios	

3.5.1.2.1	Anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa	
3.5.1.2.2	Anticuerpo anti IgG de ratón conjugado a peroxidasa	
<b>3.5.2</b>	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia del detergente dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)	Pág. 32
<b>3.5.3</b>	Transferencia	Pág. 33
<b>3.5.4</b>	Incubación de la membrana con los anticuerpos	Pág. 33
<b>3.5.5</b>	Revelado por quimioluminiscencia	Pág. 34
<b>3.6</b>	Cuantificación de proteínas totales	Pág. 35
<b>3.7</b>	Protocolos generales de trabajo con ADN	Pág. 35
<b>3.7.1</b>	Cepas bacterianas	Pág. 35
<b>3.7.2</b>	Medios de cultivo	Pág. 35
<b>3.7.3</b>	Preparación de bacterias competentes	Pág. 36
<b>3.7.4</b>	Transformación de bacterias competentes con ADN plasmídico	Pág. 36
<b>3.7.5</b>	Preparación de ADN plasmídico a baja escala (miniprep)	Pág. 37
<b>3.7.6</b>	Cuantificación de ADN	Pág. 38
<b>3.7.7</b>	Digestión con enzimas de restricción	Pág. 38
<b>3.7.8</b>	Electroforesis en geles de agarosa	Pág. 39
<b>3.7.9</b>	Reacciones de ligazón	Pág. 39
<b>3.7.10</b>	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	Pág. 40
<b>3.7.11</b>	Transfección de ADN plasmídico en células en cultivo	Pág. 40
<b>3.8</b>	Obtención de mutantes de GPAT1	Pág. 41
<b>3.8.1</b>	Clon utilizado	Pág. 41
<b>3.8.2</b>	Construcción de mutantes truncados marcados	Pág. 41

con un epítopo FLAG en el extremo C-terminal.	
<b>3.8.3</b> Construcción de mutantes truncados marcados con un epítopo HA en la región N-terminal	Pág. 42
<b>3.9</b> Inmunofluorescencia	Pág. 43
<b>3.10</b> Análisis de la interacción entre dominios citosólicos de GPAT1	Pág. 44
<b>3.10.1</b> Tratamiento con reactivos entrecruzantes y clivaje con hidroxilamina	Pág. 44
<b>3.11</b> Oligomerización de GPAT1	Pág. 45
<b>3.11.1</b> Entrecruzamiento químico	Pág. 45
<b>3.11.2</b> Solubilización con detergentes	Pág. 45
<b>3.11.3</b> Inmunoprecipitación	Pág. 47
<b>3.12</b> Ensayos de importación <i>in vitro</i>	Pág. 47
<b>3.12.1</b> Obtención de GPAT1 marcada con <sup>35</sup> S	
<b>3.12.2</b> Importación de <sup>35</sup> S-GPAT1 en distintas fracciones subcelulares	
<b>3.12.3</b> Análisis de los productos por autoradiografía	
<b>3.13</b> Esterificación de [ <sup>14</sup> C]-palmitato y análisis de los productos mediante cromatografía en capa fina (TLC)	Pág. 49

## **Capítulo 4: El hepatopáncreas de *Macrobrachium borellii* expresa una GPAT mitocondrial homóloga a la descrita en el hígado de mamíferos**

<b>4.1</b> Introducción	Pág. 50
<b>4.2</b> Objetivos específicos	Pág. 52
<b>4.3</b> Resultados	Pág. 52
<b>4.3.1</b> Caracterización de las fracciones subcelulares de hepatopáncreas de <i>M. borellii</i>	
<b>4.3.2</b> La actividad GPAT se enriqueció en mitocondrias y no en microsomas	

de las membranas mitocondriales un complejo de alto peso molecular reactivo a los anticuerpos anti-FLAG y anti-GPAT1.

**5.4** Discusión

Pág. 82

## **Capítulo 6: Los dominios citosólicos de GPAT1 interaccionan y esta interacción es esencial para la actividad de la enzima**

**6.1** Introducción

Pág. 88

**6.2** Objetivo

Pág. 91

**6.3** Resultados

Pág. 91

**6.3.1** Construcción de mutantes truncados en la región C-terminal

**6.3.2** Optimización de las condiciones de transfección transitoria y de la medida de actividad enzimática

**6.3.3** Las proteínas truncadas se expresan en las células CHO-K1 pero son enzimáticamente inactivas

**6.3.4** La inactivación de los mutantes truncados no se debe a un cambio en los parámetros cinéticos de la enzima

**6.3.5** Los mutantes truncados colocalizan con las mitocondrias

**6.3.6** Los dominios citosólicos de GPAT1 interaccionan

**6.4** Discusión

Pág. 108

## **Capítulo 7: Conclusiones generales**

Pág. 112

## **Capítulo 8: Bibliografía**

Pág. 113

# **CAPÍTULO 1**

## **Marco teórico**





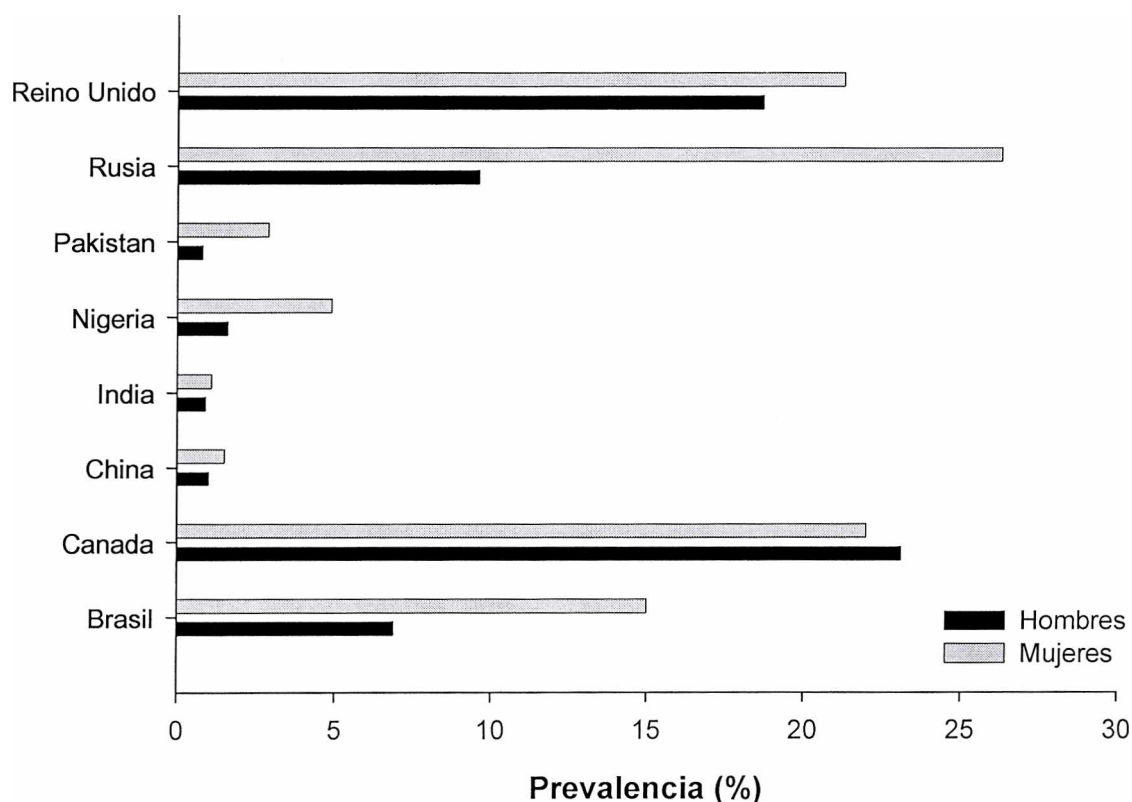
## 1.1 ¿Por qué estudiar la síntesis de triglicéridos?

Si bien en el siglo pasado las principales causas de morbilidad y mortalidad en la población mundial fueron las enfermedades infecciosas, en nuestros tiempos una de las epidemias con consecuencias devastadoras resulta ser la obesidad.

El sobrepeso y la obesidad se definen como acumulaciones excesivas o anormales de grasa que pueden afectar la salud. El índice de masa corporal (IMC) se calcula como el peso del individuo en kilogramos dividido por la estatura en metros al cuadrado y este índice se utiliza comúnmente para medir el sobrepeso y la obesidad. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) un individuo tiene sobrepeso cuando su IMC es igual o mayor a 25 kg/m<sup>2</sup> mientras que es obeso cuando el IMC es mayor o igual a 30 kg/m<sup>2</sup>.

Debido a los malos hábitos dietéticos adoptados por la población de países desarrollados o en vías de desarrollo, la prevalencia de pacientes con sobrepeso aumenta cada día, trayendo consigo un importante número de complicaciones asociadas a esta enfermedad. En la Figura 1.1 se muestra la prevalencia de obesidad (IMC  $\geq$  30 kg/m<sup>2</sup>) en la población adulta de distintos países en el año 2002 (Oto T y col, 2005).

En nuestro país, la información estadística sobre el estado nutricional de la población es escasa. En un estudio realizado a nivel nacional en el año 2001 se determinó que la prevalencia de sobrepeso en adultos es de un 36% mientras que la prevalencia de obesidad es de un 17% (Ciruzzi M, 2002).

**Figura 1.1** Prevalencia de la obesidad en el año 2002 en distintos países.

Las proyecciones realizadas por la OMS son realmente alarmantes si se tiene en cuenta que según este organismo, en el año 2015 al menos 700 millones de personas en el mundo serán obesas y aproximadamente 2300 millones tendrán sobrepeso. Estas cifras tienen un gran impacto socioeconómico, teniendo en cuenta los trastornos asociados a esta enfermedad. Por ejemplo, la obesidad es el principal factor de riesgo para enfermedades crónicas como la enfermedad cardiovascular (que constituye la principal causa de muerte mundial), la diabetes, los desórdenes musculoesqueléticos como la osteoartritis y algunos tipos de cáncer como el cáncer de mama y de colon.

## 1.2 Vías de síntesis de triglicéridos en mamíferos

Por las razones mencionadas, la síntesis de triglicéridos (TG) en mamíferos y su regulación han sido extensamente estudiadas en los últimos años.

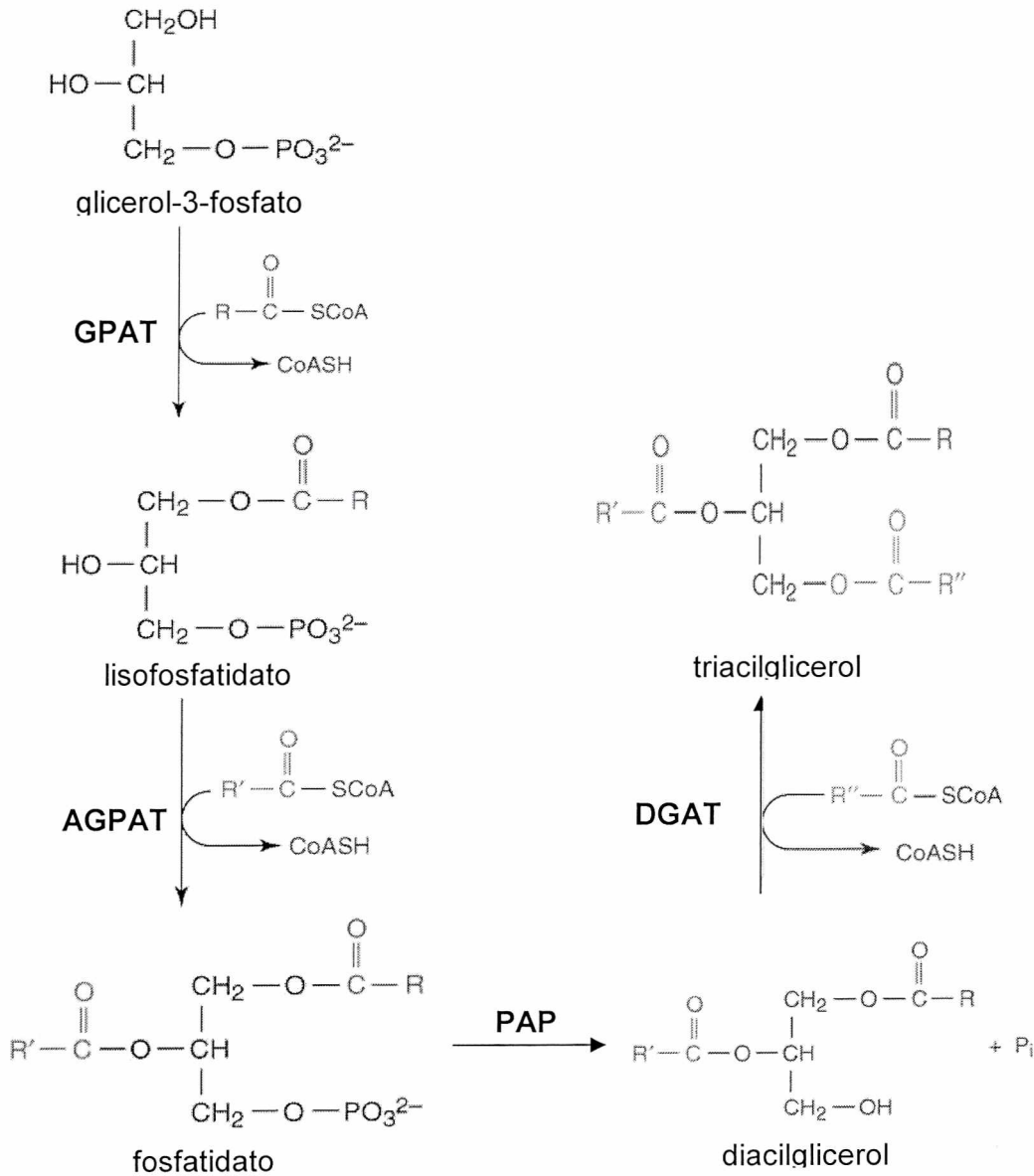
Muchos tipos celulares y órganos son capaces de sintetizar TG, pero el hígado y el intestino son los órganos más activos (Christie WW, 2003). Los TG se almacenan dentro de las células formando gotas de lípido ("*lipid droplets*") recubiertas por una monocapa de fosfolípidos y proteínas específicas que regulan su formación, crecimiento y disolución (Brasaemle DL, 2007). Se han descrito distintas vías de síntesis de TG:

### 1.2.1 Síntesis *de novo* a partir de *sn*-glicerol-3-fosfato (G3P)

Fue descrita en los años 50 por el laboratorio de Eugene Kennedy (Kennedy EP y Weiss SB, 1956; Borkenhagen LF y Kennedy EP, 1957; Kennedy EP, 1961) y es la vía mayoritaria en hígado y tejido adiposo (Figura 1.2). Comienza con la activación de los ácidos grasos de cadena larga a sus correspondientes ésteres de la coenzima A, reacción catalizada por las acilCoA sintetasas de cadena larga (ACSL).

Luego, el G3P se esterifica secuencialmente con estos acilCoAs en las posiciones *sn*-1 y *sn*-2 de la molécula, dando el ácido lisofosfatídico (ALF) y el ácido fosfatídico (AF). Estas reacciones de acilación están catalizadas por las enzimas glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT) y acilglicerolfosfato aciltransferasa (AGPAT) respectivamente. La principal fuente de G3P que alimenta esta vía metabólica proviene del catabolismo de la glucosa, aunque también en menor medida contribuye la fosforilación directa del glicerol mediante la glicerol quinasa (Christie WW, 2003).

**Figura 1.2** Síntesis de novo de triglicéridos.



Una vez formado el AF, el grupo fosfato se hidroliza en una reacción catalizada por la enzima fosfatidato fosfohidrolasa (PAP) para dar 1,2-diacil-*sn*-glicerol (DG), el cual se esterifica en la posición 3 dando

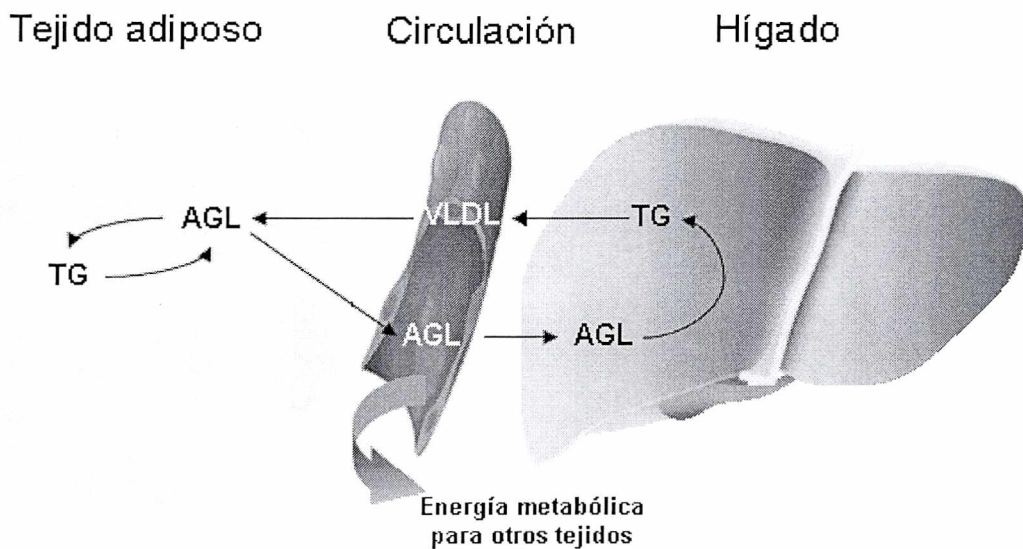
triacilglicerol (TG). Esta última reacción está catalizada por la diacilglicerol aciltransferasa (DGAT). De todas las enzimas de la vía, la actividad GPAT es la que presenta una menor actividad específica y por lo tanto se cree que es el paso limitante (Bell RM y Coleman RA, 1980).

En tejido adiposo, bajo determinados estímulos, los TG son hidrolizados para dar G3P y ácidos grasos libres (AGL). Tradicionalmente, se atribuyó esta actividad enzimática a la lipasa sensible a hormonas (HSL). Esta enzima resulta fosforilada y consecuentemente activada bajo la influencia de hormonas como la adrenalina y el glucagón. Una vez activa, HSL cataliza la hidrólisis de TG a AGL y 2-monoacilglicerol, el cual resulta hidrolizado por la monoacilglicerol lipasa (Langin D, 2006). Sin embargo, se demostró recientemente que los ratones nulos para HSL retienen un 40% de la actividad lipasa en tejido adiposo y además en este tejido, se acumulan DG y no TG (Jaworski K y col, 2007). Estos resultados promovieron la búsqueda de otra/s lipasa/s que catalizarían la hidrólisis de TG a DG en tejido adiposo. Al respecto, tres grupos de investigación independientes (Jerkins CM y col, 2004; Villena JA y col, 2004; Zimmermann R y col, 2004) propusieron que esta función sería llevada a cabo por la enzima "*adipocyte triglyceride lipase*" (ATGL) también denominada desnutrina, PNPLA2 o iPLP2- $\zeta$ . ATGL hidroliza TG en forma eficiente y su expresión es alta en tejido adiposo, moderada en músculo cardíaco y baja en los demás tejidos. La regulación de ATGL es un campo de investigación muy activo en la actualidad.

Los AGL son enviados a la circulación, donde son transportados por la albúmina. De esta manera, los TG se movilizan con el objetivo de proveer energía a los demás tejidos (Yeaman SJ, 2004). De todos modos, se ha demostrado que un 75% de los AGL provenientes de la hidrólisis de TG en tejido adiposo se reesterifican tanto en este tejido (antes de llegar a la circulación general) como en hígado (Nelson DL y Cox MM, 2005) y

esta proporción se mantiene constante, aún en condiciones de ayuno (Figura 1.3).

**Figura 1.3** Síntesis y reesterificación de ácidos grasos



El hígado no contiene una lipasa sensible a hormonas (Yeaman SJ, 2004), y este órgano secreta TG como componente de una lipoproteína de muy baja densidad (VLDL). Estudios en humanos han demostrado que el porcentaje de AGL sintetizados *de novo* que forman parte de las VLDL es muy bajo, mientras que la gran mayoría (aproximadamente un 77%) derivan de los AGL provenientes del tejido adiposo (Parks EJ y Hellerstein MK, 2000). Sólo en ciertas condiciones como en una dieta rica en fructosa o cuando existe un consumo masivo de carbohidratos existe una contribución importante de la síntesis *de novo* de AGL a los TG de las

VLDL (Parks EJ y Hellerstein MK, 2000). El rol que cumple este aparente ciclo fútil de TG no está totalmente dilucidado.

Se ha sugerido también que los TG que forman parte de las VLDL provienen de un *pool* citosólico de almacenamiento, el cual sufre hidrólisis y reesterificación previa incorporación a las partículas de VLDL (Wiggins D y Gibbons GF, 1992; Yang LY y col, 1995). En este sentido, se ha clonado el gen que codifica para una lipasa hepática microsomal que sería la responsable de la hidrólisis de los TG almacenados en el hepatocito (Lehner R y col, 1999). Esta enzima se localiza en el lumen del retículo endoplasmático, particularmente en regiones que rodean a las mitocondrias (Gilham D y col, 2005).

### **1.2.2 Vía del monoacilglicerol**

Otra ruta de síntesis de triglicéridos descrita en mamíferos es la vía del monoacilglicerol (MG). Mediante la misma, se sintetiza el 75% de los TG en los enterocitos (Christie WW, 2003). En la luz del intestino, los TG de la dieta son hidrolizados por la lipasa pancreática a 2-MG y AGL. Estas moléculas son captadas por los enterocitos y una vez allí, el MG se reesterifica para dar DG, reacción catalizada por la monoacilglicerol aciltransferasa (MGAT); finalmente los DG se esterifican en una reacción catalizada por DGAT para dar TG (Figura 1.4).

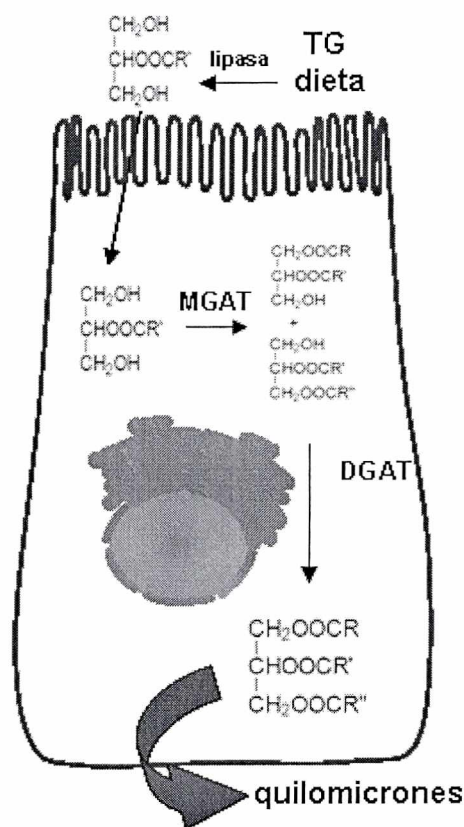
### **1.2.3 Transacilación acilCoA independiente**

Se ha descrito una tercer vía, mucho menos importante desde el punto de vista cuantitativo, en las microvellosidades del intestino delgado. Consiste en una transacilación acilCoA independiente en la que dos moléculas de DG racémicos reaccionan para dar TG y MG (Figura 1.4). La enzima que cataliza esta reacción se denomina diacilglicerol transacilasa (Lehner R y Kuksis A, 1993). Al igual que los TG



que forman parte de las VLDL, se ha sugerido que los TG que forman parte de los quilomicrones también derivan de un *pool* citosólico (Yang LY y Kuksis A, 1991); de esta manera la enzima mencionada participaría en el remodelado de TG que finalmente son secretados hacia la circulación portal bajo la forma de quilomicrones.

**Figura 1.4** Síntesis de triglicéridos mediante la vía del monoacilglicerol.

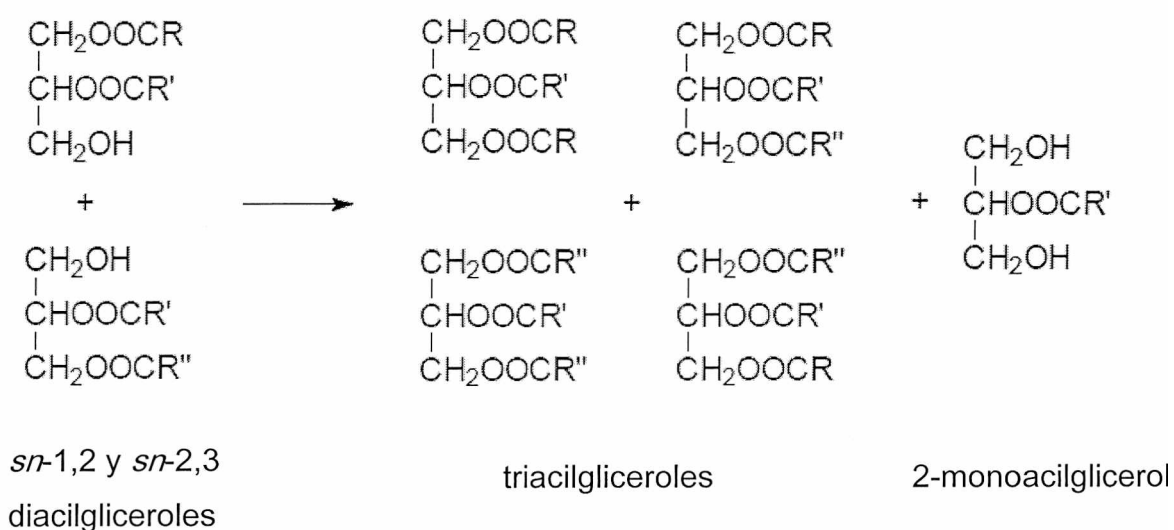


### 1.3 Enzimas que catalizan la síntesis *de novo* de glicerolípidos

A diferencia de otras vías metabólicas, se han descrito múltiples isoenzimas que catalizan cada uno de los pasos de la síntesis de glicerolípidos en mamíferos. Si bien el clonado de muchos de los genes que codifican para estas enzimas ha permitido avanzar en cuanto al

conocimiento de sus funciones específicas, el panorama actual sobre los roles fisiológicos que cumplen cada una de ellas resulta incompleto. A continuación se realizará una breve descripción de las enzimas que catalizan la síntesis *de novo* de glicerolípidos, haciendo hincapié en aquellas involucradas en la síntesis de TG.

**Figura 1.5** Síntesis de triglicéridos mediante transacilación acilCoA independiente.



### 1.3.1 Activación de los ácidos grasos: síntesis de acilCoAs por sintetetasas de cadena larga (ACSL)

La activación de los ácidos grasos bajo la forma de ésteres de la coenzima A requiere ATP y la reacción está catalizada por las ACSL. Estos ácidos grasos activados participan en distintos procesos como su oxidación mitocondrial o la síntesis de triglicéridos, fosfolípidos y ésteres de colesterol. Hasta el momento, se han clonado cinco isoenzimas diferentes a partir de distintos tejidos de rata: ACSL1, ACSL2, ACSL3, ACSL4

y ACSL5 (Coleman RA y col, 2002). La expresión de cada una de ellas (cuantificada mediante su ARN mensajero) resulta diferencial en los distintos tejidos y además cada isoenzima tiene distinta especificidad de sustrato.

La ACSL1 se encuentra en todos los tejidos estudiados pero su expresión es máxima en hígado y tejido adiposo. Se localiza en retículo endoplasmático y una región especializada del mismo denominada membranas asociadas a mitocondrias (MAM); activa ácidos grasos saturados e insaturados y su regulación es compatible con un rol en la activación de ácidos grasos destinados a la síntesis de TG (Coleman RA y col, 2002).

La isoformas ACSL2 y ACSL3 se clonaron a partir de una biblioteca de ADN complementario de cerebro de rata, donde su expresión es máxima. De todas las isoformas de ACSL, éstas son las menos caracterizadas. Su expresión varía durante el desarrollo embrionario (Coleman RA y col, 2002).

La ACSL4 tiene una notable preferencia por los ácidos grasos araquidónico y docosahexaenoico. Se expresa principalmente en la glándula adrenal, donde el ácido araquidónico corresponde al 40% de los ácidos grasos de la membrana y se localiza principalmente en peroxisomas (Coleman RA y col, 2002).

La ACSL5 es la única isoenzima mitocondrial descrita hasta el momento. Teniendo en cuenta su localización, originalmente se planteó que ACSL5 estaría involucrada en la activación de ácidos grasos para su posterior  $\beta$ -oxidación (Coleman RA y col, 2002). Sin embargo, estudios que involucraron la sobreexpresión (Mashek DG y col, 2006) y la regulación de esta isoenzima demostraron que estaría involucrada en la síntesis de TG hepáticos (Lewin TM y col, 2002; Horton JD y col, 2003; tom Dieck H y col, 2005).

### 1.3.2 Síntesis de 1-acil-sn-glicerol-3-fosfato (ácido lisofosfatídico, ALF)

La acilación del G3P mediante acil-CoA está catalizada por la enzima glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT). Tradicionalmente se han descrito en células de mamífero dos isoenzimas con distinta localización subcelular:

Glicerol-3-fosfato aciltransferasa microsomal: esta isoenzima da cuenta del 90% de la actividad GPAT total en la mayoría de los tejidos. Es sensible al calentamiento y resulta inhibida cuando se la trata con reactivos que reaccionan con grupos sulfhidrilo como la N-etilmaleimida (NEM). Tiene igual preferencia por ácidos grasos saturados e insaturados y su actividad no se modifica con cambios en la dieta o mediante variaciones hormonales (Coleman RA y Lee DP, 2004). Si bien la mayoría de los genes que codifican para las enzimas de esta vía metabólica fueron clonados durante la década del 90', recién en el año 2006 se clonó un gen que codifica para una GPAT microsomal (GPAT3) (Cao J y col, 2006). En este trabajo se demostró mediante PCR cuantitativa que GPAT3 se expresa principalmente en tejido adiposo e intestino delgado siendo relativamente baja su expresión en el hígado. Además, se demostró que el ARN mensajero (ARNm) aumenta durante la diferenciación de los adipocitos y en tejido adiposo bajo la influencia de agonistas de PPAR $\gamma$ . La sobreexpresión de GPAT3 en células HEK293 conduce a un aumento selectivo de los TG y no de los fosfolípidos. Estos resultados sugieren una función de GPAT3 en la síntesis de TG.

En un trabajo presentado en agosto de 2007 en FASEB Summer Research Conferences se propuso que otra isoforma de GPAT, denominada GPAT4, corresponde a la isoforma microsomal hepática (Coleman RA y col).

Isoformas mitocondriales de GPAT: la existencia de una GPAT mitocondrial resistente al NEM fue documentada ya en los años 70' pero recién en 1988 se clonó el gen que codifica para esta enzima (GPAT1) (Paulauskis JD y Sul HS, 1988). GPAT1 se localiza en la membrana mitocondrial externa y su actividad corresponde al 10% de la actividad total en la mayoría de los tejidos, excepto en hígado donde puede alcanzar el 50% en determinadas condiciones. A diferencia de la GPAT microsomal, es resistente al tratamiento con NEM y tiene preferencia por los ácidos grasos saturados (Coleman RA y Lee DP, 2004).

Recientemente, se ha clonado el gen que codifica para una nueva isoenzima mitocondrial, la GPAT2 (Wang S y col, 2007). GPAT2 comparte homología de secuencia con GPAT1 pero a diferencia de ésta es sensible al tratamiento con NEM y sus características cinéticas y bioquímicas son similares a las descritas para la GPAT microsomal (Lewin TM y col, 2004). El ARNm es muy abundante en testículo y la sobreexpresión en células en cultivo también conduce a un aumento en la síntesis de TG. Hasta el momento, solo se ha medido una actividad GPAT NEM sensible en mitocondrias de ratones nulos para GPAT1.

### **1.3.3 Síntesis de ácido fosfatídico (AF).**

El AF se sintetiza mediante acilación del ALF en una reacción catalizada por la acilCoA:acilglicerolfosfato aciltransferasa (AGPAT). En base a homología de secuencias, se identificaron al menos 8 genes que codifican para AGPATs putativas, pero solo en algunos casos los genes clonados rinden enzimas activas.

El gen de la AGPAT1 humana codifica para una proteína de 283 aminoácidos. El ARNm se expresa en todos los tejidos humanos ensayados, con una alta expresión en hígado, corazón, células del sistema inmune y epitelio (West J y col, 1997; Stamps AC y col, 1997;

Eberhardt C y col, 1997). Se localiza en retículo endoplasmático y tiene igual preferencia por acilCoAs saturados e insaturados de 12 a 18 carbonos (Aguado B y Campbell RD, 1997). Se ha sugerido un rol de AGPAT1 en la traducción de señales (Bursten SL y col, 1991; West J y col, 1997; Aguado B y Campbell RD, 1998) así como también en la síntesis de triglicéridos (Ruan H y Pownall HJ, 2001).

El gen que codifica para AGPAT2 se clonó a partir de su alta homología de secuencia con la AGPAT de levaduras (West J y col, 1997). Este gen se expresa en la mayoría de los tejidos con una alta expresión en hígado y corazón (West J y col, 1997; Eberhardt C y col, 1997). Tiene preferencia por 20:4-CoA. AGPAT2 es deficitaria en la lipodistrofia congénita, indicando que es necesaria para la síntesis de TG en tejido adiposo, donde su expresión es dos veces mayor que AGPAT1 (Agarwal AK y col, 2002).

Las AGPATs putativas -3, -4, -5 y -7 no han sido caracterizadas y no se tiene información sobre sus funciones. Según homología de secuencias, es muy probable que la AGPAT5 corresponda a una isoforma de GPAT microsomal (Coleman RA, Comunicación personal).

Se ha obtenido información en cuanto a la función de AGPAT6 en un modelo de ratón deficiente en el gen que codifica para esta proteína (Vergnes L y col, 2006). En este trabajo se demostró que determina el contenido y composición de los triglicéridos del tejido adiposo e hígado y que su función no puede ser suplantada por otras AGPATs. Existen evidencias que esta isoforma corresponde a la isoforma microsomal de GPAT hepática (denominada GPAT4) (Coleman RA y col, FASEB Summer Reaserch Conferences 2007).

La isoforma originalmente identificada como AGPAT8 corresponde a GPAT3.

### 1.3.4 Síntesis de diacilglicerol (DG)

El AF constituye un punto de ramificación importante en la vía de síntesis de glicerolípidos. Por un lado, puede convertirse en CDP-diacilglicerol, un precursor de la síntesis de los fosfolípidos ácidos fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol y cardiolipina, o también puede ser defosforilado para dar DG, un precursor de la síntesis de TG y de los fosfolípidos fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina.

El AF resulta defosforilado en una reacción catalizada por la enzima ácido fosfatídico fosfohidrolasa (PAP). Existen al menos dos tipos de PAP: la actividad PAP-1 resulta inhibida por NEM y es dependiente de  $Mg^{++}$  mientras que la PAP-2 es resistente al NEM y no resulta estimulada por el  $Mg^{++}$  (Jamal Z y col, 1991). De las dos actividades solo PAP-1 estaría involucrada en la síntesis de TG, mientras que PAP-2 controla la traducción de señales. Hasta el momento se han descrito tres isoenzimas de PAP-2 (Brindley DN, 2004) y debido a su gran variedad en la especificidad de sustrato se les ha dado el nombre de lípido fosfato fosfatasas (LPPs).

PAP1 trasloca hacia el retículo endoplasmático bajo la influencia de los ácidos grasos o acilCoAs (Gomez-Munoz A y col, 1992). Su actividad resulta estimulada bajo la influencia del glucagón, glucocorticoides, y hormona del crecimiento mientras que resulta inhibida por la insulina (Brindley DN, 1984). En un trabajo publicado en el año 2007 (Donkor J y col, 2007) se demostró que los tres miembros de la familia de proteínas denominadas lipinas tienen actividad PAP-1. La lipina-1 corresponde a la actividad PAP-1 del tejido adiposo, mientras que las lipinas -2 y -3 representan la actividad PAP-1 del hígado, placenta y cerebro.

### 1.3.5 Síntesis de triacilgliceroles

La formación de TG puede ser catalizada por distintas actividades enzimáticas; en mamíferos se han detectado las actividades diacilglicerol:acilCoA aciltransferasa (DGAT) que cataliza la acilación de *sn*-1,2-DG y la actividad *sn*-1,2(2,3)-DG transacilasa. La actividad DGAT es alta en órganos donde es muy activa la síntesis de TG: tejido adiposo, hígado, glándula mamaria, intestino delgado y glándula adrenal. Se han clonado los genes que codifican para dos isoenzimas: DGAT1 y DGAT2. Estos genes provienen de familias diferentes que no comparten homología de secuencia.

Estas isoenzimas parecen tener roles fisiológicos diferentes como quedó demostrado con los experimentos realizados con ratones *knockout* para estos genes. Los ratones *Dgat2*<sup>-/-</sup> mueren a las pocas horas de nacer, tienen disminuido el contenido general de TG en un 90% y carecen de ácidos grasos esenciales. Por estas razones se cree que DGAT2 cumple un rol preponderante en la síntesis de TG. Por el contrario, los ratones *Dgat1*<sup>-/-</sup> son viables, tienen una mayor sensibilidad a la insulina y son resistentes a la obesidad y a la esteatosis hepática. De esta manera se ha propuesto que la inhibición de DGAT1 podría funcionar como una buena estrategia farmacológica para el tratamiento de la obesidad (Chen HC y Farese Jr RV, 2005).

## 1.4 Glicerol-3-fosfato aciltransferasa-1: un punto clave en la regulación de la síntesis de triglicéridos hepáticos

Numerosos trabajos realizados utilizando diversos modelos experimentales *in vivo* e *in vitro* demuestran que la isoforma mitocondrial NEM resistente GPAT1 inicia la síntesis de triglicéridos en el hígado:

a) La expresión del ARNm de GPAT1 está regulada nutricional y hormonalmente, de un modo compatible con un rol crítico en la síntesis



de TG (Gonzalez-Baró MR y col, 2007). Cuando se alimentan ratones previamente ayunados con una dieta rica en carbohidratos y libre en grasas, el ARNm para GPAT1 se incrementa en el hígado más de 20 veces, mientras que la actividad enzimática aumenta seis veces (Coleman RA y col, 2000). También en hígado de rata perfundido, la insulina incrementa la actividad de GPAT1 en un 34% (Coleman RA y col, 2000). Por el contrario, el ayuno y el estado diabético inducido mediante estreptozotocina disminuyen la expresión y actividad de GPAT1. También disminuye la transcripción del gen *Gpat1* cuando se administra dibutilil-AMPc, un análogo liposoluble del AMPcíclico, señalando la inhibición de su síntesis mediada por adrenalina o glucagón.

b) El primer estudio de sobreexpresión heteróloga transitoria se realizó en las líneas celulares CHO-K1 y HEK-293. En este trabajo (Igal RA y col, 2001) se demostró que la misma provoca un incremento de la masa de TG intracelulares y de la esterificación de [<sup>14</sup>C]oleato exógeno en TG. Estos resultados fueron corroborados utilizando como modelos la sobreexpresión en cultivos primarios de hepatocitos (Lewin TM y col, 2005) y la sobreexpresión *in vivo* (Linden D y col, 2006). En estos trabajos se vio además que la sobreexpresión de GPAT1 disminuye la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos y aumenta la secreción y el contenido de TG en el plasma.

c) Los ratones *knockout* para GPAT1 *gpat1*<sup>-/-</sup> tienen disminuido el contenido de TG en el hígado, en la grasa gonadal y en el plasma. Además, en este modelo, disminuye la secreción de VLDL hepática con respecto a los ratones control (Hammond LD y col, 2002).

La actividad y regulación de la isoforma GPAT1 ha cobrado un gran interés en la comunidad científica, ya que la acumulación de grasa ectópica en tejidos como el hígado o el músculo tiene un impacto negativo en la sensibilidad a la insulina en humanos (Garg A y Misra A, 2002; Thuresson ER, 2004; Petersen KF y Shulman GI, 2006). En este sentido,

se ha propuesto que la acumulación de grasa en el hígado es un factor predisponente para el desarrollo de diabetes de tipo 2. En la mayoría de los trabajos donde se estudiaron los efectos de la esteatosis hepática sobre la sensibilidad a la insulina se utilizaron modelos de ratones obesos, lo cual no resulta del todo adecuado ya que la obesidad en sí es un factor independiente para la predisposición a la insulinoresistencia. Sin embargo, en un trabajo publicado en el marzo de 2007 se demostró que la sobreexpresión de GPAT1 en hígado de rata causa una resistencia a la insulina tanto hepática como sistémica en ausencia de otros factores como la obesidad o las dietas lipogénicas (Neagle CA y col, 2007).

#### 1.4.1 Regulación transcripcional de GPAT1

La regulación transcripcional de la expresión de GPAT1 está mediada por la acción de la insulina, a través del factor de transcripción *sterol regulatory element binding protein 1* (SREBP-1). El promotor murino de *Gpat1* contiene tres sitios consenso para la unión de SREBP-1 que son responsables de la transactivación del gen *Gpat1* mediada por SREBP-1. La sobreexpresión del gen que codifica para SREBP-1c en células 3T3-L1 incrementa la expresión del ARNm de *Gpat1* 6,7 veces y además, en los ratones transgénicos *srebp-1a* y *1c* el ARNm hepático se incrementa 10 y 3 veces, respectivamente (Gonzalez-Baró MR y col, 2007).

Por lo tanto, si bien una dieta rica en carbohidratos incrementa el ARNm para *Gpat1*, la regulación de la transcripción procede a través de la transactivación de *Srebp-1c* mediada por insulina, y no a través de elementos de respuesta a carbohidratos (chREBPs).

#### 1.4.2 Regulación postranscripcional de GPAT1

El flujo de AGL a través de vías metabólicas degradativas o biosintéticas está regulado entre otros mecanismos, mediante la proteína

quinasa dependiente de AMP (AMPK), un sensor de la disponibilidad de energía en la célula. La AMPK es activa cuando la carga energética celular es baja; actúa inhibiendo la actividad de enzimas biosintéticas y estimulando la actividad de enzimas catabólicas involucradas en la producción de ATP. Una de las enzimas clave inhibida por AMPK es la acetilCoA carboxilasa. El producto de la reacción catalizada por esta enzima, el malonilCoA, es un precursor de la síntesis de AGL así como también un potente inhibidor de la  $\beta$ -oxidación mitocondrial (Viollet B y col, 2006). Por lo tanto, cuando se activa AMPK se activa el flujo de acilCoAs hacia la vía degradativa. Como era de esperar, la actividad GPAT mitocondrial también está modulada por AMPK. Se ha descrito la inhibición de GPAT1 mediante tratamiento con AMPK recombinante y mediante el tratamiento con un activador de la misma, el 5-amino-4-imidazolcarboxamidaribósido (AICAR). (Muoio DM y col, 1999; Park H y col, 2002).

También se ha demostrado la fosforilación y activación de GPAT1 cuando se incuban mitocondrias de hígado de rata con caseína quinasa 2 recombinante (CK2), una enzima involucrada en el ciclo celular, la neoplasia y la señalización mediante infección viral (Onorato TM y col, 2005). Dado que CK2 es activa constitutivamente, el significado fisiológico de esta activación mediada por CK2 resulta aún incierto.

Teniendo en cuenta que se ha descrito una discrepancia notable entre expresión y actividad de GPAT1 en todos los tejidos ensayados (Lewin TM y col, 2001), es probable que operen muchas otras modificaciones postranscripcionales no dilucidadas hasta el momento.

# **CAPÍTULO 2**

## **Objetivos generales**



La existencia de múltiples isoenzimas con actividad glicerol-3-fosfato aciltransferasa en células eucariotas es indicativa, muy probablemente, de que cada una de ellas cumple una función específica en el metabolismo de glicerolípidos.

Este rol diferencial puede ser llevado a cabo mediante distintos mecanismos, como una localización estratégica de cada una de ellas en distintos compartimentos subcelulares, la formación de complejos multienzimáticos que canalicen los sustratos hacia determinados productos y la regulación diferencial de cada isoenzima en respuesta a diferentes señales.

Los objetivos principales del presente trabajo de tesis fueron estudiar los aspectos estructurales que determinan la actividad de GPAT1 de rata: su localización subcelular y submitocondrial, la formación de complejos homo u heterooligoméricos y la existencia de dominios regulatorios que condicionen la actividad de la enzima.

También se planteó como objetivo, estudiar la síntesis *de novo* de glicerolípidos en un modelo de animal invertebrado, con el propósito de comprobar si la compartimentación observada en células de mamífero es un proceso conservado en la evolución.

# **CAPÍTULO 3**

## **Metodología**





## 3.1 Modelos experimentales

### 3.1.1 *Rattus norvegicus*

Se utilizaron ratas macho jóvenes de la cepa Wistar de 60-70 días de edad, con un peso aproximado de 180-200 gramos, provenientes del Bioterio General de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata.

Los animales se mantuvieron en cuarto de cría a temperatura controlada (23°C) con ciclos fijos de luz/oscuridad de 12 horas. Las ratas fueron alimentadas con una dieta comercial completa para roedores (Cargill). Tanto el alimento como el agua se les administraron *ad libitum*.

La eutanasia de los animales se implementó mediante decapitación, procedimiento virtualmente indoloro por su rapidez y que permite obtener flúidos y tejidos anatómicamente intactos y no contaminados químicamente. Dicho procedimiento fue realizado por personal experimentado del Bioterio. Luego del sacrificio, se extrajeron los hígados y se colocaron en buffer fosfato salino (PBS, fosfato de sodio 10 mM; NaCl 150 mM, pH=7,4).

### 3.1.2 *Machrobrachium borellii*

Se utilizó como modelo de animal invertebrado a esta especie de camarón de agua dulce, que pertenece al orden Decapoda y a la familia Palaemonidae.

Los ejemplares de *M. borellii* fueron colectados en el Arroyo del Pescado, sobre la ruta provincial N°11 Km 15, partido de Magdalena, Provincia de Buenos Aires.

*M. borellii* es un crustáceo que vive asociado a la vegetación, no encontrándose en las regiones estancadas del cuerpo de agua. Para la captura de los mismos se utilizó un copo de arrastre.

Los animales fueron transportados vivos hasta el laboratorio en el agua del arroyo y se tomaron las medidas necesarias para poder disminuir al máximo el estrés, como ser: evitar el exceso de calor, luz, ruidos y movimiento. En el laboratorio, fueron aclimatados en acuarios con agua corriente de clorinada evitando principalmente el shock térmico y la descompensación química. Se mantuvieron bajo aireación controlada, se alimentaron diariamente y el agua se renovó cada cinco días hasta el momento de los experimentos.

Las disecciones se realizaron bajo lupa, utilizando instrumental de microcirugía. De acuerdo con las medidas de la Asociación Americana de animales de laboratorio, los animales fueron previamente anestesiados, sometiéndolos a una temperatura de 0 °C durante aproximadamente 2 minutos. Se realizaron dos hendiduras paralelas en el cefalopereion, se retiró la región dorsal del exoesqueleto, y se extrajo el hepatopáncreas. Se tuvo especial cuidado con el manipuleo del órgano, evitando la ruptura del tejido. Los hepatopáncreas enteros se colocaron en buffer de homogenización previamente enfriado sobre hielo (buffer H: Hepes-KOH 10 mM, pH 7.4, sacarosa 0,25 M, EDTA 1 mM y 1 mM DTT con el agregado de 0,002% v/v de cocktail inhibidor de proteasas de uso general SIGMA) y luego fueron procesados para obtener las distintas fracciones subcelulares.

### 3.1.3 Células en cultivo

Se utilizó como modelo de célula eucariota a la línea CHO-K1 (ATCC CCL-61). Esta línea celular se derivó originalmente como sub-clon a partir de una línea parental obtenida de una biopsia de ovario de

hamster chino adulto. Esta línea celular se utiliza comúnmente para la expresión de proteínas heterólogas.

Las células fueron cultivadas en placas de 60 mm de diámetro en medio esencial mínimo (MEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Las placas fueron incubadas a 37 °C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Para subcultivar las células, se removió el medio de cultivo y se enjuagó la superficie celular con buffer PBS estéril para remover las trazas de suero que pudieran contener inhibidor de tripsina. Se agregaron luego 0,5 ml de solución de tripsina 0,25% (p/v)/EDTA 0,5 mM por placa y se observaron las células en microscopio invertido por contraste de fases. Una vez dispersadas, se agregaron 5 ml de medio de cultivo, se aspiraron las células y se agregaron alícuotas de 0,5 ml por placa de 60 mm de la suspensión anterior en un volumen final de 3 ml.

## **3.2 Fraccionamientos subcelulares**

### **3.2.1 Obtención de fracciones subcelulares de hígado de rata.**

**3.2.1.1** Obtención de homogenato, mitocondrias crudas y microsomas.

Una vez extraído el órgano se enjuagó con PBS y se sumergió en 10 ml de buffer H con el agregado de 0,002% v/v de cocktail inhibidor de proteasas de uso general (SIGMA) previamente enfriado en hielo, se taró y se completó el volumen con buffer H de modo de obtener una relación 5 ml de buffer/gramo de hígado. Se cortó el órgano en pequeños trozos utilizando material de cirugía y los mismos se trasvasaron a un homogeneizador de vidrio/teflón tipo Potter. Se homogeneizó el tejido utilizando un sistema motorizado (Tri-R Instruments, 1000 rpm) y se filtró a

través de gasa. Este homogenato total se centrifugó a 600 x g durante 5 minutos a 4 °C en una centrífuga Sorvall RC-100 con el objetivo de eliminar los materiales más pesados como trozos de tejido, células enteras y núcleos. Se repitió el procedimiento una vez más y de esta manera se obtuvo a partir del sobrenadante la fracción denominada **homogenato**, de la cual se tomaron alícuotas para su posterior análisis. Esta fracción se centrifugó a 10.000 x g durante 15 minutos a 4 °C en una centrífuga Sorvall RC-10. El pellet se resuspendió en 1ml de buffer H/ gramo de hígado, y se colocó en un homogeneizador manual con vástago de vidrio; se procedió a la homogenización y de esta manera se obtuvo la fracción denominada **mitocondrias crudas**. El sobrenadante se centrifugó a 100.000 x g durante 1 hora a 4 °C en una ultracentrífuga Beckman LE-80K, utilizando un rotor 70.1 Ti. El pellet se resuspendió en buffer H y de esta manera se obtuvo la fracción denominada **microsomos**.

**3.2.1.2** Obtención de mitocondrias puras, membranas asociadas a mitocondria y fracción MAV.

Para purificar las mitocondrias crudas se utilizó un método descrito previamente (Hovius R y col, 1990). El procedimiento se basa en la centrifugación isopícnica, y utiliza como medio para generar el gradiente de densidad al polímero sintético Percoll (Amersham Biosciences). Este polímero consiste en una dispersión coloidal formada por partículas de sílica recubiertas con polivinilpirrolidona que tienen un tamaño de 15 a 30 nm. El Percoll puede utilizarse para generar gradientes continuos, discontinuos y también gradientes generados *in situ*, ya que cuando la dispersión se centrifuga a más de 10.000 x g en un rotor de ángulo fijo las partículas sedimentan, formando un gradiente de densidad a lo largo del

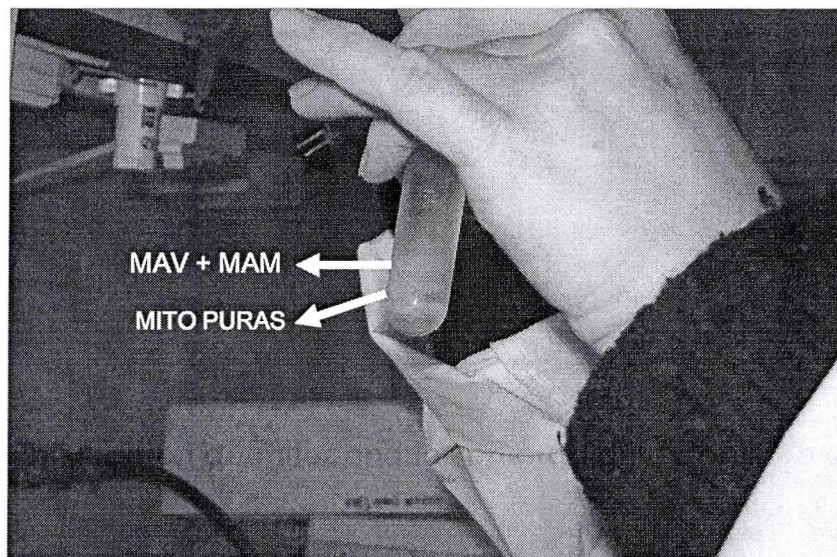
tubo. Como el Percoll tiene una osmolaridad muy baja, al formarse el gradiente de densidad no se genera un gradiente de osmolaridad.

El método de purificación seleccionado se basa en la utilización de un gradiente generado *in situ*. Para ello, se preparó una dispersión de Percoll al 30% v/v en un medio isotónico mezclando 3 ml de Percoll, 5 ml de buffer H 2X con inhibidor de proteasas y 2 ml de agua bidestilada. Se cargaron 9 ml de esta dispersión en cada botella de policarbonato (Beckman) de 10 ml y por encima se cargó 1 ml de suspensión de mitocondrias crudas. Se centrifugaron los tubos a 95.000 x g durante 30 minutos a 4 °C en un rotor 70.1 Ti en una ultracentrífuga Beckman LE-80K y de esta manera se separaron dos bandas claramente distinguibles: una banda inferior densa color marrón oscuro e inmediatamente por encima una banda superior más clara de aspecto amarillento (Figura 3.1).

La banda inferior se colectó con jeringa Hamilton de 500 µl, se diluyó 4 veces con buffer H y se centrifugó a 10.000 x g durante 10 minutos a 4 °C. El pellet obtenido se lavó dos veces con buffer H y finalmente se resuspendió en este mismo buffer; la fracción obtenida se denominó **mitocondras puras**.

También se colectó la banda superior, se diluyó 4 veces con buffer H y se centrifugó a 10.000 x g durante 10 minutos a 4 °C. El pellet de esta centrifugación se lavo dos veces, se resuspendió en buffer H y la fracción obtenida se denominó **MAV** ("*mitochondrial associated vesicles*"). El sobrenadante se centrifugó a 100.000 x g durante 1 hora a 4 °C utilizando un rotor 70.1 Ti en una ultracentrífuga Beckman LE-80K. El material obtenido corresponde a la fracción denominada **MAM** ("*mitochondrial associated membranes*").

### **Figura 3.1** Purificación de mitocondrias en gradiente continuo de Percoll



**Figura 3.1.** Este procedimiento rinde dos bandas: una superior de donde se aíslan las fracciones MAV y MAM y una inferior que corresponde a mitocondrias puras.

#### **3.2.2 Obtención de fracciones subcelulares de hepatopáncreas de camarón**

La metodología empleada para la obtención de fracciones subcelulares de hepatopáncreas de camarón fue esencialmente idéntica a la descrita en para el fraccionamiento de hígado de rata. Las fracciones obtenidas en este caso se denominaron, **homogenato**, **mitocondrias** y **microsomas**.

#### **3.2.3 Obtención de la fracción de membranas totales de células en cultivo**

Las monocapas de células CHO-K1 crecidas en placas de 60 mm de diámetro al nivel de confluencia apropiado se colocaron sobre hielo, se retiró el medio de cultivo y se enjuagaron dos veces con buffer PBS enfriado en hielo. Luego se agregaron 500  $\mu$ l de buffer H con inhibidor de

proteasas y se rasparon las células utilizando trozos de placa radiográfica, previamente tratada con hipoclorito de sodio para remover los gránulos de plata. Se repitió este procedimiento una vez más y ambos volúmenes se trasvasaron a un homogenizador tipo Polter de vidrio/teflon de 1ml de capacidad. Se homogenizó el material y se centrifugó a máxima velocidad (16.000 x g) durante 10 minutos en una microcentrífuga de mesa a 4 °C. El pellet se resuspendió en 500 µl de buffer H por placa de 60 mm y el material obtenido se denominó **membranas totales**.

### 3.3 Fraccionamiento submitocondrial

Las fracciones submitocondriales se obtuvieron siguiendo un método descrito previamente (Fraser F y Zammit VA, 1998) con modificaciones. Como material de partida se utilizaron mitocondrias de hígado de rata, tanto crudas como puras. Se preparó una suspensión de este material en buffer fosfato de potasio 10 mM pH 7,4 (medio hipotónico) de modo de obtener una concentración de proteína total de 50 mg/ml y se incubó en hielo durante 20 minutos. Mediante este procedimiento se expande el volumen mitocondrial con la consiguiente ruptura de la membrana mitocondrial externa. Luego se agregó sacarosa 60 % p/v y se incubó otros 20 minutos en hielo, lo que produce la contracción de la membrana mitocondrial interna. La suspensión se sonicó durante tres períodos de 30 segundos a la máxima amplitud en un sonicador Branson S-450A (utilizando un micropunta especial para tejidos animales). Se centrifugó a 6.300 x g durante 10 minutos para eliminar las mitocondrias intactas o no rotas en su totalidad y el pellet se descartó. El sobrenadante se sometió a ultracentrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa. Se utilizaron tubos de centrífuga Beckman de Polyallomer de 11x60 mm en los que se colocaron tres colchones de 1,2 ml cada uno de soluciones de sacarosa 51,3%, 37,7% y 25,2% p/v en buffer fosfato de

potasio 10 mM pH 7,4. Cada tubo se cargó con 0,5 ml de la suspensión sonicada y se centrifugó a 121.000 x g durante 1 hora a 4 °C (rotor SW 60, ultracentrífuga Beckman LE-80K). Al cabo de la centrifugación se obtuvieron dos bandas y un pellet en el fondo del tubo: de la interfase 25,2%/37,7% se colectó la fracción **membrana mitocondrial externa** y de la interfase 37,7%/51,2% se colectó la fracción **sitios de contacto**. Estas fracciones se lavaron diluyéndolas 10 veces en buffer fosfato de potasio 10 mM pH 7,4 y centrifugando a 180.000 x g (rotor 70.1 Ti, ultracentrífuga Beckman). A partir del pellet se obtuvo la fracción **membrana mitocondrial interna**.

### 3.4 Determinación de actividades enzimáticas

#### 3.4.1 Medición de la actividad glicerol-3- fosfato aciltransferasa (GPAT)

La actividad GPAT se midió siguiendo un protocolo descrito previamente (Gonzalez-Baro y col, 2001) con modificaciones. La cantidad apropiada de muestra se diluyó en solución isotónica de sacarosa 0,25 M y se agregó a la mezcla de reacción, de modo de obtener un volumen final de 200 µl. La composición final de la mezcla de reacción fue: buffer Tris-HCl 75 mM pH= 7,4, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mg/ml BSA (libre de ácidos grasos), 8 mM NaF, 1 mM DTT, 0.8 mM glicerol-3-fosfato (0.5 µCi [<sup>14</sup>C]glicerol-3-fosfato, Amersham Biosciences) y 10-120 µM de palmitoil-CoA. La reacción se inició con el agregado de la muestra y al cabo de 10 minutos de incubación a 37 °C se frenó con 600 µl de HClO<sub>4</sub> 1%. La radiactividad presente en los productos de reacción solubles en cloroformo se determinó en un contador de centelleo líquido.

Para analizar los productos de la reacción, se extrajeron los lípidos mediante el procedimiento de Folch (Folch J y col, 1957) y se analizaron



mediante TLC en un sistema hexano-eter etílico-ácido acético (80:20:1.5 v/v) o cloroformo-metanol- ácido acético-agua (65:25:1:4 v/v) para lípidos neutros y polares respectivamente.

Para determinar la actividad GPAT sensible a N-etilmaleimida (NEM), se midió la actividad total (actividad GPAT) y la actividad en presencia de NEM 2 mM (actividad GPAT NEM resistente). La actividad NEM sensible se obtuvo por diferencia.

### 3.4.2 Medición de la actividad de enzimas marcadoras

**3.4.2.1 Arilesterasa:** (E.C 3.1.1.2). Esta enzima cataliza la hidrólisis de ésteres carboxílicos. Se localiza en el retículo endoplasmático de células eucariotas y por lo tanto la medida de su actividad se utiliza como marcadora de dicho compartimento subcelular. Para su determinación se utilizó un método descrito previamente (Shephard EH y Hubscher G, 1969) con modificaciones. El medio de reacción contuvo 50 mM de buffer fosfato de K, pH 6,8 y 0,02-0,1 mg de proteína total de la fracción a ensayar en un volumen final de 1 ml. El sustrato utilizado fue el acetato de indoxilo (Fluka AG, CH-9470). El mismo se preparó pesando la cantidad apropiada de reactivo, disolviéndola en etanol 100% y completando con agua de modo de obtener una solución 25 mM en 50% de etanol. La reacción se inició con el agregado de 30  $\mu$ l de esta solución de sustrato al medio de reacción y la aparición de producto se midió mediante la lectura de la absorbancia a 386 nm. Para el cálculo de la actividad específica se utilizó el coeficiente de extinción molar del indoxilo  $\epsilon = 3,0 \times 10^3$ .

**3.4.2.2 Citocromo c oxidasa:** (E.C 1.9.3.1). Esta enzima es la oxidasa terminal del metabolismo aerobio de todos los animales, plantas, levaduras y algunas bacterias. Se localiza en la membrana mitocondrial

interna de las células eucariotas y durante muchos años se la ha utilizado como enzima marcadora de esta membrana y por lo tanto para detectar la presencia de mitocondrias en fracciones subcelulares. Para su determinación se utilizó un kit comercial marca SIGMA (código del producto CITOCOX 1). La determinación de la actividad enzimática se basa en la medida de la disminución de la absorbancia a 550 nm del ferrocitocromo c causada por su oxidación a ferricitocromo c, reacción catalizada por la citocromo c oxidasa. El medio de reacción contuvo 10 mM Tris-HCl, pH 7,0 , 120 mM KCl , la cantidad apropiada de muestra diluída en buffer 10 mM Tris-HCl, pH 7,0, sacarosa 0,25 M, todo en un volumen final de 1,05 ml. La reacción se inició con el agregado de 50  $\mu$ l de ferrocitocromo c 0,22 mM. Esta reacción es bifásica, con una velocidad inicial muy rápida, seguida de una velocidad menor. La medición de la absorbancia a 550 nm durante los primeros 45 segundos permitió obtener la velocidad inicial de reacción, con la que se calculó la actividad específica de las muestras. La unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que oxida 1  $\mu$ mol de ferrocitocromo c por minuto a pH 7.0 y a 25°C.

**3.4.2.3** Monoaminoxidasa (MAO): (E.C 1.4.3.4). Esta enzima cataliza la oxidación de monoaminas a los correspondientes aldeídos y se localiza en la membrana mitocondrial externa, por lo que se la utiliza como marcadora de esta membrana. El método escogido para su determinación en el presente trabajo fue el descrito originalmente por Tabor (Tabor CW y col, 1954) y modificado posteriormente por Salach (Salach JI, 1979). En este método se utiliza como sustrato a la benzilamina, cuya oxidación catalizada por MAO da como producto benzaldehído y el ensayo espectrofotométrico se basa en la diferencia que existe en el coeficiente de absortividad molar entre benzilamina y benzaldehído a

250 nm. Se colocó en cubeta de cuarzo 1 ml de buffer fosfato 0,2M, pH=7,2/ Triton X-100 0,6% (p/v), 50 µl de muestra y agua bidestilada hasta un volumen final de 1,85 ml. Se incubó a 30 °C durante 5 minutos y se inició la reacción con el agregado de 100 µl de benzilamina 0,1M, neutralizada a pH 7,0 con HCl. Se siguió la cinética registrando el aumento de absorbancia a 250 nm producido por la oxidación de la benzilamina.

**3.4.2.4** Fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1): se utilizó el gen que codifica para la enzima fosfatasa alcalina placentaria como reportero de la expresión de genes transfectados con liposomas catiónicos. La actividad enzimática se midió en los sobrenadantes de los cultivos celulares utilizando un kit comercial de la marca Wiener (número de catálogo 1361401).

## **3.5 Detección de proteínas por la técnica Western blot**

### **3.5.1 Anticuerpos utilizados**

#### **3.5.1.1 Anticuerpos primarios**

3.5.1.1.1 Anticuerpo anti-GPAT1: fue provisto por la Dra. Rosalind Coleman del Departamento de Nutrición, Pediatría y Medicina de la Universidad de Carolina del Norte. Para su obtención, la GPAT1 recombinante sobre-expresada en células de insecto Sf21 se purificó y se envió a la compañía ImmunoDynamics, la Jolla, CA donde se obtuvo el anticuerpo policlonal en conejo. Este anticuerpo se utilizó a una dilución de 1/10000 en buffer PBS con el agregado del detergente Tween-20 a una concentración de 0,005 % v/v (PBS-T). El anticuerpo reconoce en forma específica a las isoformas mitocondriales GPAT1 y GPAT2.

3.5.1.1.2 Anticuerpo anti-VDAC: El canal aniónico dependiente de voltaje o porina mitocondrial (VDAC, voltage-dependent anion channel) es una proteína localizada en la membrana mitocondrial externa. Existen dos isoformas, VDAC1 y VDAC2. Para su detección se utilizó un anticuerpo policlonal comercial obtenido en conejo (Affinity BioReagents, número de catálogo PA1-954), a una dilución de 1/1000 en buffer PBS-T. El anticuerpo detecta ambas isoformas, generándose una doble banda a la altura de aproximadamente 30 kDa.

3.5.1.1.3 Anticuerpo anti-GRP78: la proteína regulada por glucosa de 78 kDa (GRP78) pertenece a la familia de las chaperonas HSP70 y reside en el retículo endoplasmático. Se asocia con proteínas de exportación o de membrana recién sintetizadas para detectar posibles errores en el plegamiento de las mismas. Para su detección se utilizó un anticuerpo policlonal comercial obtenido en conejo (Affinity BioReagents, número de catálogo PA1-014) a una dilución 1/1000 en buffer PBS-T. El anticuerpo detecta una proteína de 78 kDa sólo en células de rata, ratón y hamster.

3.5.1.1.4 Anticuerpo anti-PEMT2: la proteína fosfatidiletanolamina metiltransferasa-2 se expresa exclusivamente en hígado de rata y se la utiliza como enzima marcadora de la fracción MAM (membranas asociadas a mitocondrias). El anticuerpo policlonal utilizado en el presente trabajo fue provisto por el Dr. Dennis Vance del Departamento de Bioquímica y Medicina de la Universidad de Alberta, Canadá. Se obtuvo inmunizando conejos con un péptido correspondiente a la región carboxilo-terminal de la proteína y el material cedido correspondió al suero liofilizado. Para los ensayos de Western blot, se utilizó una solución 100 µg/ml de suero liofilizado en PBS-T.

3.5.1.1.5 Anticuerpo anti-FLAG: se utilizó un anticuerpo monoclonal comercial (SIGMA, código del producto F3165) que reconoce la secuencia aminoacídica DYKDDDDK. Para ensayos de Western blot se lo utilizó a una dilución 1/2500 en buffer PBS-T.

3.5.1.1.6 Anticuerpo anti-HA: se utilizó un anticuerpo monoclonal comercial (COVANCE, número de catálogo MMS-101P) que reconoce el epítoto hemaglutinina de influenza (YPYDVPDYA). Se lo utilizó a una dilución 1/1000 en PBS-T.

### 3.5.1.2 Anticuerpos secundarios

3.5.1.2.1 Anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa: se utilizó un anticuerpo policlonal comercial (Pierce, código del producto 31460) a una dilución de 1/5000-1/10000 en PBS-T.

3.5.1.2.2 Anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa: se utilizó un anticuerpo policlonal comercial (Pierce, código del producto 31168) a una dilución de 1/5000-1/10000 en PBST.

## 3.5.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia del detergente dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE).

SDS-PAGE es la electroforesis de proteínas más ampliamente usada. La técnica fue descrita por Laemmli (Laemmli UK, 1970). Se trata de un tipo de electroforesis en la que las proteínas presentes en la muestra se desnaturalizan por calor en presencia de los agentes desnaturalizantes  $\beta$ -mercaptoetanol, que reduce los puentes disulfuro y el detergente dodecilsulfato de sodio (SDS). Este detergente se une a las cadenas polipeptídicas desnaturalizadas con una relación de 1,4 g de SDS por g de proteína, uniéndose aproximadamente una molécula de SDS por cada dos aminoácidos de la cadena. Esta unión masiva de moléculas de SDS bloquea la carga propia de la molécula de proteína y

le confiere al complejo una carga neta negativa proporcional a su masa, haciendo que todas las proteínas acomplejadas con SDS viajen hacia el ánodo. La separación de los complejos SDS-proteína es proporcional sólo a la masa de la proteína pues todas tienen la misma carga por unidad de masa. Se puede entonces determinar el peso molecular aparente de cualquier proteína por comparación con un patrón de proteínas de pesos moleculares conocidos.

Para el armado de los geles y la corrida electroforética se utilizó el sistema comercial Mini-Protean® III de BIO-RAD, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó el sistema de buffers discontinuo descrito por Laemmli (Lammeli UK, 1970). Los accesorios utilizados permitieron la preparación de geles de 0,75 mm de espesor, 10 cm de ancho y 7,5 cm de alto. Las corridas se realizaron a 120 V utilizando una fuente de poder modelo PowerPac Basic Power Supply de la marca BIO-RAD.

### **3.5.3 Transferencia**

Para la transferencia de las proteínas separadas por SDS-PAGE a membranas de difluoruro de polivilideno (PVDF, Immun-Blot PVDF Membrane, BIO-RAD número de catálogo 162-0177) se utilizó el sistema húmedo Mini Trans-Blot Cell de BIO-RAD. Previo a la transferencia, tanto la membrana como el gel y los papeles de filtro accesorios se equilibraron durante 10 minutos en buffer de transferencia (Tris-HCl 125 mM, glicina 0,1 M, 20% metanol). Se armó entonces el "sandwich" según las instrucciones del fabricante y se procedió a la transferencia durante 1 hora a 100V.

### **3.5.4 Incubación de la membrana con los anticuerpos**

Luego de la electrotransferencia, las membranas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave o toda la

noche a 4 °C. Como bloqueante se utilizó leche en polvo descremada (marca Svelty, Nestlé) al 5% disuelta en buffer PBS-T.

Luego del bloqueo, se incubó con el anticuerpo primario a la dilución apropiada durante 1 hora. Cumplido ese tiempo, se realizaron 6 lavados de 5 minutos cada uno con PBS-T y se procedió al agregado del anticuerpo secundario a la dilución apropiada durante 1 hora. Al finalizar se lavó 6 veces durante 5 minutos con PBS-T y se procedió al revelado.

### 3.5.5 Revelado por quimioluminiscencia

Se preparó solución de revelado A mezclando 50 µl de solución de luminol (Sigma, número de catálogo A8511) 44 mg/ml en dimetilsulfóxido (DMSO), 22 µl de solución de ácido p-cumárico (Sigma, número de catálogo C9008) 15 mg/ml en DMSO, 333 µl de buffer Tris-HCl 1 M pH 8 y la cantidad suficiente de H<sub>2</sub>O bidestilada hasta completar un volumen de 5 ml y solución de revelado B mezclando 3 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 110 volúmenes, 333 µl de buffer Tris-HCl 1 M pH 8 y la cantidad suficiente de H<sub>2</sub>O bidestilada hasta completar un volumen de 5 ml.

En el cuarto de revelado se procedió a la mezcla de las soluciones de revelado A y B y se incubó la membrana con dicha mezcla durante 1 minuto. Posteriormente se secó la membrana, se colocó en un casete de exposición (X-Omatic cassette, Kodak) y se expuso durante 1-5 minutos ante una placa radiográfica (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences). Al cabo del tiempo indicado, se reveló la placa y las bandas obtenidas se analizaron mediante el *software* Kodak Digital Science 1D (Kodak).

Alternativamente, se utilizó el kit comercial SuperSignal West Pico de la marca Pierce (número de producto 34081).

### 3.6 Cuantificación de proteínas totales

Se midió el contenido de proteínas totales mediante el método de Lowry (Lowry OH y col, 1951). El primer paso de esta reacción colorimétrica implica la formación de un complejo cobre-proteína en un medio alcalino. Este complejo reduce posteriormente a un reactivo fosfomolibdico-fosfowolfrámico (reactivo de Folin) produciendo una coloración azul intensa, proporcional a la cantidad de enlaces peptídicos presentes en el tubo. La intensidad de color se cuantificó a 750 nm en un espectrofotómetro modelo Helios  $\beta$  (Thermo Corporation). En cada determinación se construyó una curva de calibración utilizando albúmina sérica bovina como patrón.

### 3.7 Protocolos generales de trabajo con ADN

#### 3.7.1 Cepas bacterianas

Se utilizó la cepa JM109 de la bacteria *Escherichia coli*; esta cepa resulta adecuada para las aplicaciones de clonado de rutina ya que carece de los genes que codifican para endonucleasa A y recombinasa A ( $recA^-$  y  $endA^-$ ) lo que facilita la estabilidad y la calidad de las preparaciones de plásmido obtenidas a partir de la misma. Esta cepa es sensible al antibiótico ampicilina.

#### 3.7.2 Medios de cultivo

Se utilizó el medio de Luria Bertani (LB) cuya composición es 10 g/l triptona (Britania), 5 g/l de extracto de levadura (Britania), y 5 g/l de NaCl (Carlo Erba). Como medio sólido se utilizó LB adicionado con 1,5% de agar-agar. Tanto LB como LB-agar se esterilizaron en autoclave.



### 3.7.3 Preparación de bacterias competentes

Se utilizó el método descrito por Inoue (Inoue H y col, 1990). Se partió de un stock de bacterias *Escherichia coli* de la cepa JM109 congeladas a -70°C conservadas en medio LB con el agregado de 15% v/v de glicerol. Se hizo una estría en una placa de Petri con medio LB-agar y se incubó a 37°C durante una noche. Al día siguiente, se transfirió una colonia aislada a 25 ml de medio LB, y se incubó durante 6-8 horas a 37°C con una agitación de 175 rpm. Se tomó 1 ml de este cultivo saturado, se diluyó en 100 ml de LB y se incubó a 18-22 °C con agitación hasta alcanzar una densidad óptica de 0,5. Cuando el cultivo alcanzó la densidad óptica deseada, se transfirió a dos tubos de centrifuga estériles que se mantuvieron en hielo durante 10 minutos y luego se centrifugaron a 5.000 x g durante 10 minutos a 4°C para coleccionar el pellet de bacterias. Los dos pellet obtenidos se resuspendieron en un volumen final de 32 ml de solución de competencia estéril (MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O 1,088% p/v; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,22% p/v; KCl 1,865% p/v; Pipes 0,01 M) enfriada en hielo, y se centrifugó nuevamente de la misma manera. El sobrenadante se descartó y el pellet de bacterias se resuspendió en 8 ml de solución de competencia y se adicionó 7% v/v de dimetilsulfóxido (DMSO). Por último, las bacterias resuspendidas se alicuotaron en fracciones de 200 µl y se congelaron a -70°C hasta su uso.

### 3.7.4 Transformación de bacterias competentes con ADN plasmídico

Se adicionaron aproximadamente 10 ng de ADN plasmídico sobre 200 µl de suspensión de bacterias competentes y se incubó en hielo durante 30 minutos. El tubo se transfirió a un baño de agua a 42°C para realizar un shock térmico de 90 segundos de duración. Transcurrido ese tiempo, se lo transfirió inmediatamente a 0 °C y se agregaron 0,8 ml de

medio SOC (peptona 20 g/l; extracto de levadura 5 g/l; NaCl 0,584 g/l; KCl 0,186 g/l; Glucosa 20 mM; pH 7). El tubo se incubó entonces a 37°C durante 1 hora con agitación (Sambrook y col, 1989).

Luego de la incubación, las bacterias se sembraron en placas de LB agar con el antibiótico de selección correspondiente (100 µg/ml de medio de cultivo) y se incubaron a 37°C durante una noche para que desarrollen las colonias transformantes.

### **3.7.5 Preparación de ADN plasmídico a baja escala (miniprep)**

Para la selección de clones positivos se utilizó la siguiente técnica. Se transfirieron colonias individuales a tubos Falcon de 50 ml con 5 ml de medio LB conteniendo el antibiótico de selección que corresponda (100 µg/ml) y se incubaron una noche a 37°C con agitación fuerte (175-200 rpm). Posteriormente, se transfirieron en forma estéril 1,5 ml del cultivo anterior a un tubo eppendorf y se centrifugó a 12.000 x g durante 2 min a 4°C. El pellet se resuspendió con vórtex en 100 µl de solución I (Tris-HCl pH 8,0, 25 mM; EDTA pH 8,0, 10 mM; Glucosa 50 mM, ARNasa 10 µg/ml). Se adicionaron 200 µl de solución II (NaOH 0,2M; SDS 1%) recientemente preparada, mezclando por inversión e incubando a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación, se adicionaron 150 µl de solución III (60ml de acetato de potasio 5M, 11,5 ml de ácido acético, y agua destilada c.s.p. 100 ml) enfriada en hielo. Luego de incubar en hielo durante 10 minutos, se centrifugó a 12.000 x g durante 10 minutos a 4 °C, transfiriéndose el sobrenadante a un tubo eppendorf limpio. A continuación, se agregaron 450 µl de una mezcla SS-fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (24:24:1 v/v/v), se agitó fuertemente, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 10.000 x g durante 10 minutos. A la fase acuosa superior se le agregaron entonces 2,5 volúmenes de etanol 96%, 0,1 volúmenes de solución de acetato de

sodio 3M pH 5,2 y se mantuvo a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos para que precipite el material plasmídico. Se centrifugó a  $15.000 \times g$  durante 15 minutos y el pellet obtenido se lavó con etanol al 70%, se secó al vacío y se resuspendió en  $50\ \mu\text{l}$  de buffer TE (Tris-HCl 10 mM, pH=7,4; EDTA 0,1 mM, PH= 8). El ADN plasmídico así obtenido, se conservó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. (Sambrook J y col, 1989).

De manera alternativa, cuando se requirió una mayor pureza de la preparación, como por ejemplo antes de una reacción de secuenciación, el ADN plasmídico se purificó utilizando un kit comercial (GFX microplasmid kit, Amersham Biosciences, número de catálogo 27-9601-02) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para obtener ADN plasmídico a mayor escala se utilizó un kit comercial de la compañía Invitrogen (PureLink HiPure Plasmid DNA, número de catálogo K2100-04).

### **3.7.6 Cuantificación de ADN**

Para la cuantificación de las muestras de ADN (minipreparaciones de plásmido, fragmentos de PCR, oligonucleótidos utilizados como cebadores, etc), se midió la absorbancia a 260 nm. Para el cálculo de la concentración de ADN se tuvo en cuenta la posible contaminación de la muestra con proteínas (lectura a 280 nm) o con fenol (lectura a 230 nm) y se efectuaron las correcciones correspondientes.

### **3.7.7 Digestión con enzimas de restricción**

Cada corte con enzimas de restricción se llevó a cabo siguiendo estrictamente las instrucciones del fabricante (New England Biolabs). Una mezcla de reacción típica incluyó: buffer de reacción 10 X adecuado ( $1\ \mu\text{l}$ ), ADN a analizar (50-100 ng), la o las correspondientes enzimas de restricción ( $10\text{U}/\mu\text{l}$ , 2-5 U) y agua libre de nucleasas (c.s.p  $10\ \mu\text{l}$ ).

La mezcla de reacción se incubó durante 1-2 horas a la temperatura correspondiente. Finalizada la incubación, se adicionaron 2 µl de buffer para siembra en gel 6X (Glicerol 50% v/v en buffer TAE 1 X: Tris 0,04 M; Na.Acetato.3H<sub>2</sub>O 0,02 M; EDTA-Na<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 1 mM; pH 7,2; azul de bromofenol 1% p/v; xileno-cianol 1% p/v) (Sambrook J y col, 1989).

### 3.7.8 Electroforesis en geles de agarosa

Para la preparación de los geles se utilizó la Agarosa M de Amersham Biosciences a una concentración que osciló entre 0,8 y 1,5% en peso, disuelta en buffer TBE (Tris 0,05 M; Acido Bórico 0,05 M; EDTA-Na<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 1 mM ). Las corridas electroforéticas se realizaron en una cuba horizontal (Hoeffer HA 33, Amersham Biosciences) utilizando TBE como buffer de corrida.

Las bandas de ADN se observaron a través de transiluminación UV (Hoefer MacroVue UV-20) con previa tinción de los geles con solución de bromuro de etidio (0,5 µg/ml). Para realizar el análisis correspondiente, los geles se fotografiaron utilizando una cámara de fotos digital KD120 (Kodak) y se analizaron con el software Kodak Digital Science 1D (Kodak).

### 3.7.9 Reacciones de ligazón

Para el clonado de insertos en los distintos vectores se utilizó la enzima T4 DNA ligasa siguiendo las instrucciones del fabricante (New England Biolabs). Se utilizó una relación molar inserto:vector de 3:1 y se incubó la mezcla a a 37°C durante 1 hora o a 16 °C toda la noche. Luego se inactivó la enzima incubando a 65 °C durante 10 minutos (Sambrook J y col, 1989).

### 3.7.10 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se utilizó un ciclador modelo PCR Express (Thermo-Hybaid). Una reacción típica incluyó: ADN molde (1-10 ng), buffer de reacción Pfu 1X (Stratagene), desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) 200  $\mu$ M, cebadores 2  $\mu$ M y 2,5 unidades de Pfu polimerasa (Stratagene). Se realizaron 30-35 ciclos con los siguientes pasos: 1 minuto a 94°C (temperatura de desnaturalización), 0,5-2 minutos a 55-62°C (temperatura de apareamiento) y 0,5-2 minutos a 72°C (temperatura de extensión), precedidos por una desnaturalización del ADN molde de 4-5 minutos a 94°C (Sambrook J y col, 1989)

### 3.7.11 Transfección de ADN plasmídico en células en cultivo

Para la transfección de las distintas construcciones se utilizaron liposomas catiónicos comerciales (Lipofectamine®, Invitrogen). El sistema se optimizó en placas de 24 pocillos y se llevó a escala para utilizar células CHO-K1 cultivadas en placas de 60 mm al 70-80% de confluencia. La cantidad adecuada de plásmido para obtener un nivel de expresión apropiado fue de 5  $\mu$ g por placa. Esta cantidad de ADN se diluyó en medio de cultivo OPTI-MEM (Invitrogen, Gibco) con el agregado de 20  $\mu$ l de lipofectamina y se incubó la mezcla durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron entonces 2,5 ml de esta mezcla por placa y se incubó durante 5 horas a 37 °C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, momento en el que se agregaron 2,5 ml de MEM suplementado con 20% de suero fetal bovino. Las células fueron incubadas en las condiciones antes mencionadas hasta cumplirse 27 horas desde el agregado del ADN plasmídico (Gonzalez-Baro y col, 2001).

## 3.8 Obtención de mutantes de GPAT1

### 3.8.1 Clon utilizado

El clon a partir del cual se obtuvieron las distintas construcciones mutantes fue el marco de lectura abierto que codifica para la enzima glicerol-3-fosfato aciltransferasa mitocondrial 1 (NM\_008149), obtenido a partir de hígado de rata (Ganesh BB y col, 1999). Dicho clon fue cedido por la Dra. Rosalind Coleman del Departamento de Nutrición, Pediatría y Medicina de la Universidad de Carolina del Norte.

### 3.8.2 Construcción de mutantes truncados marcados con un epítopo FLAG en el extremo C-terminal.

La construcción de mutantes truncados a nivel de los aminoácidos 626 y 742 de la proteína a los que se les adicionó un epítopo FLAG (DYKDDDDK) en el extremo C-terminal, se realizó utilizando PCR en dos etapas. Como ADN molde se utilizó al plásmido pcDNA3.1 cuyo inserto correspondía al marco de lectura abierto de la GPAT1. En la primera etapa se utilizó como cebador directo a un oligonucleótido que contenía un sitio de corte *Bam*HI y las primeras bases del marco de lectura abierto de la enzima (Tabla 3.1). Para construir Tr626-FLAG se utilizó como cebador reverso un oligonucleótido que contenía las bases complementarias a los codones que codifican para los aminoácidos 599-626 seguidas de las que codifican para los primeros 7 aminoácidos del epítopo FLAG. Para construir Tr742-FLAG se utilizó como cebador reverso un oligonucleótido que contenía las bases complementarias a los codones que codifican para los aminoácidos 735-742 seguidas de las que codifican para los primeros 7 aminoácidos del epítopo FLAG. Los productos amplificados en estas PCR se purificaron (GFX PCR DNA and Gel band Purification kit, Amersham Biosciences, número de catálogo 27-

9602-01) y se utilizaron como molde para la etapa siguiente, en la que se utilizó el mismo cebador directo que en la etapa anterior y como cebador inverso un oligonucleótido que codifica para los 8 aminoácidos del péptido FLAG, un codón de stop y un sitio de restricción *XbaI*. Los productos resultantes de la segunda etapa de amplificación se purificaron, se digirieron con las enzimas *BamHI* y *XbaI* y se insertaron en el sitio de policlonado del plásmido pcDNA3.1 (Invitrogen), adecuado para la expresión en células eucariotas por tener un promotor de citomegalovirus. Las construcciones fueron confirmadas mediante el secuenciación.

### **3.8.3 Construcción de mutantes truncados marcados con un epítipo HA en la región N-terminal.**

Se utilizó como molde para PCR, el ADN complementario que codifica para el marco de lectura abierto de la GPAT1 con un epítipo hemaglutinina HA antes del aminoácido 33 (HA-GPAT). El cebador directo contenía un sitio de corte *BamHI* y las primeras bases del marco de lectura abierto de la enzima, y el cebador reverso un sitio *XbaI* y 21 bases complementarias a los codones del marco de lectura abierto de GPAT1 que codifican para los aminoácidos 620–626 (HA-Tr626), 736–742 (HA-Tr742) y 778–784 (HA-Tr784). Los productos resultantes se purificaron, se digirieron con las enzimas *BamHI* y *XbaI* y se insertaron en el sitio de policlonado del plásmido pcDNA3.1. Las construcciones fueron confirmadas mediante el secuenciamiento de las mismas.

**Tabla 3.1**

CEBADOR	CONSTRUCCIÓN	SECUENCIA
Directo	Todas	ATCGC <b>GGATCC</b> ACCATGGAGGAGT
Reverso	Tr626-FLAG (1 <sup>er</sup> PCR)	GTCATCGTCGTCCTTTATAGTCGAGAAGGTAGCACAGACTGGCG
	Tr742-FLAG (1 <sup>er</sup> PCR)	GTCATCGTCGTCCTTTATAGTCGAAGGTGTGGACAAAGATGGCAGC
	Tr626-FLAG y Tr742-FLAG (2 <sup>da</sup> PCR)	CGCCT <b>CTAGACT</b> ACTTGTGCATCGTCGTCCTTTATAGTC
	HA-Tr626	CTGAT <b>CTAGACT</b> AGAGAAGGTAGCACAGACTGGC
	HA-Tr742	TGCAT <b>CTAGACT</b> AACTCTGGGACTGG
	HA-Tr784	AGTT <b>CTAGACT</b> ATTTCACAGCATTCTTCACAAGAC
	HA33-FL	AAGT <b>CTCGAGCT</b> ACAGCACCACGAAGCTTAGAATGTATCC

### 3.9 Inmunofluorescencia

Para realizar los ensayos de colocalización se cultivaron células CHO-K1 hasta un 70% de confluencia en placas de 60 mm que contenían tres cubreobjetos de vidrio estériles de 18 x 18 mm; se transfectaron con las distintas construcciones clonadas en el vector de expresión en células eucariotas pcDNA 3.1 y se incubaron durante 27 horas a 37 °C, momento en el que se enjuagaron con buffer PBS estéril tibio y se agregó medio de cultivo con el marcador mitocondrial fluorescente MitoTracker® (CMW-ROS, Molecular Probes, Invitrogen, número de catálogo M7513) a una concentración de 0,1 µM durante 25 minutos. Se lavaron las células con PBS y se fijaron en metanol durante 10 minutos a -20 °C. Para la permeabilización selectiva de la membrana plasmática las células se fijaron con paraformaldehído 2,5% y se trataron con el detergente digitonina a una concentración de 10 µg/ml. Luego se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con las siguientes diluciones de anticuerpos primarios: 1/1000 anti-FLAG y 1/500 anti-HA. Se realizaron 5 lavados de 5 minutos con buffer PBS y se incubaron con el anticuerpo



secundario conjugado al fluorescente Alexa Fluor488® (goat anti-mouse IgG, Molecular Probes, Invitrogen, número de catálogo A-11029) a una dilución 1/200 durante 45 minutos en oscuridad. Finalmente, se lavaron las células con PBS, se montaron los cubreobjetos con glicerol al 50% y se visualizaron los preparados en un microscopio confocal Olympus FV 300 equipado con un láser He-Ne de 543 y 633 nm localizado en el Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Buenos Aires.

### **3.10 Análisis de la interacción de los dominios citosólicos de GPAT1**

#### **3.10.1 Tratamiento con reactivos entrecruzantes y clivaje con hidroxilamina**

Las membranas totales obtenidas a partir de células CHO-K1 que sobreexpresaron HA-GPAT-FLAG, HA-Tr742 y HA-Tr784 (400 µg de proteína total) se trataron con los reactivos entrecruzantes disuccinimidil suberato (DSS, Pierce), un reactivo homobifuncional con un brazo de 7 Å que reacciona con grupos amino y su análogo hidrosoluble bis(sulfosuccinimidil)suberato, (BS<sup>3</sup>, Pierce) durante 1 hora a 0 °C. La concentración final de los reactivos entrecruzantes fue 1 mM. Al cabo del tiempo indicado las muestras se centrifugaron a máxima velocidad en una microcentrífuga de mesa durante 10 minutos y se resuspendieron en 200 µl de una solución Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,2M pH 9/ 2M guanidina-HCl/ 2 M hidroxilamina. Se incubaron entonces a 40 °C durante 4 horas y al cabo de ese tiempo se dializaron contra buffer Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,2M pH 9 utilizando una membrana de diálisis de 12 KDa de corte. Las muestras dializadas se recogieron, se evaporaron en una bomba Speed Vac SC110 (Savant), se

resuspendieron en buffer muestra y se sembraron en un gel SDS-PAGE 12%. Una vez separadas las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF, la que se incubó inicialmente con el anticuerpo anti-FLAG y el correspondiente anticuerpo secundario. Luego del revelado, los anticuerpos se removieron mediante el tratamiento de la membrana con una solución 100 mM 2-mercaptoetanol, 2% SDS en buffer Tris-HCl pH 6,7 durante 30 minutos a 50 °C. Se volvió a bloquear la membrana y se reincubó con el anticuerpo anti-HA y el correspondiente anticuerpo secundario, luego de lo cual se reveló mediante quimioluminiscencia.

### **3.11 OLIGOMERIZACIÓN DE GPAT1**

#### **3.11.1 Entrecruzamiento químico**

Se trataron mitocondrias crudas de hígado de rata (50-200 µg de proteína total), membranas totales provenientes de células CHO-k1 transfectadas con GPAT-FLAG, Tr626-FLAG, Tr-742-FLAG (100 µg de proteína total) y membranas totales de células Mc. Ardle Rh7777 transfectadas con un adenovirus que porta el gen que codifica para GPAT-FLAG (100 µg de proteína total) con los reactivos entrecruzantes DSS y BS<sup>3</sup> a distintas concentraciones (0-2 mM). Los productos de la reacción de entrecruzamiento se separaron en SDS-PAGE 6%, se transfirieron a membranas PVDF y se incubaron con anticuerpo anti-FLAG y el correspondiente anticuerpo secundario.

#### **3.11.2 Solubilización con detergentes**

Para solubilizar GPAT1 de la membrana externa de mitocondrias crudas obtenidas a partir de hígado de rata o para solubilizar GPAT-FLAG de membranas totales obtenidas a partir de células CHO-K1, se utilizaron

distintos detergentes. Los pellet de mitocondrias crudas (100-400  $\mu$ g de proteína total) o las membranas totales provenientes de las células de una placa de 60 mm, se resuspendieron en 1 ml de buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,4 conteniendo cada uno de los detergentes a la concentración micelar crítica o a 10 veces dicha concentración (Garavito RM y col, 2001) (Tabla 3.2) y se incubaron durante 1 hora a 4°C con agitación. Luego se centrifugaron los tubos a 16000 x g durante 10 minutos en una microcentrífuga refrigerada y los sobrenadantes (20  $\mu$ l) se analizaron en geles de poliacrilamida en gradiente 4-20 % nativos, se transfirieron a membranas PVDF y se incubaron con anticuerpos anti-FLAG o anti-GPAT1. El revelado se realizó por quimioluminiscencia.

**Tabla 3.2**

Detergente	Concentración micelar crítica
Triton-X100	0,2 mM
Colato de sodio	14 mM (0,4%)
CHAPS	8 mM (0,49%)
CHAPSO	8 mM (0,5 %)
Desoxi BIGCHAP	1,4 mM (0,12%)
BIGCHAP	2,9 mM (0,25%)

### 3.11.3 Inmunoprecipitación

Con el objetivo de inmunoprecipitar GPAT-FLAG a partir de células CHO-K1 transfectadas se utilizó un kit comercial de la marca SIGMA (FLAGIPT-1), siguiendo las instrucciones del fabricante. El buffer de lisis provisto por este kit contiene el detergente Triton X-100 al 1%. De modo alternativo, se utilizaron los detergentes listados en la Tabla 3.2 para realizar el paso de solubilización de la proteína y se continuó según el protocolo original. También se utilizó la sonicación para favorecer la ruptura de la membrana y liberación de la proteína.

## 3.12 ENSAYOS DE IMPORTACIÓN *IN VITRO*

### 3.12.1 Obtención de GPAT1 marcada con $^{35}\text{S}$

Para la obtención de GPAT1 marcada radiactivamente con  $^{35}\text{S}$  se utilizó un sistema comercial de transcripción/traducción *in vitro* (TNT® T7 coupled transcription/translation system, Promega). Como ADN molde se utilizó al marco de lectura abierto de la GPAT1 clonado en el vector pGEM-11zf(+) (Promega), que cuenta con un promotor T7. La reacción se llevó a cabo en presencia del aminoácido metionina marcado con  $^{35}\text{S}$  (Amersham Biosciences, SJ1515, 0,06 pmol, 60  $\mu\text{Ci}$  en un volumen de reacción de 50  $\mu\text{l}$ ) siguiendo las instrucciones del fabricante. El tiempo óptimo de reacción fue de 90 minutos a 30 °C.

### 3.12.2 Importación de $^{35}\text{S}$ -GPAT1 en distintas fracciones subcelulares

Se incubaron 100  $\mu\text{g}$  de proteína total de mitocondrias (puras o crudas) o microsomas con 5  $\mu\text{l}$  del producto de reacción del punto anterior. El buffer de importación que resultó adecuado contuvo: HEPES-KOH 10 mM, sacarosa 0,25M, EDTA 1 mM, BSA 2 mg/ml, DTT 1mM, acetato

de potasio 100 mM, ATP 2 mM, fosfocreatina 5 mM, fosfocreatina kinasa 100 µg/ml, NADH 1 mM, espermidina 0,6 mM, pH 7,4. La reacción se llevó a cabo a 30 °C durante períodos variables de tiempo. Para frenarla, se diluyó la mezcla 5 veces en buffer H enfriado en hielo y se centrifugó a 16.000 x g durante 10 minutos en una microcentrífuga refrigerada en el caso de las mitocondrias o a 100.000 x g en ultracentrífuga en el caso de los microsomas. Los pellet fueron resuspendidos en buffer muestra para SDS-PAGE.

Para establecer si la proteína importada se internaliza en la membrana se procedió luego del ensayo de importación, al lavado de las mitocondrias con una solución de KCl 0,25M o con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,1M pH 11,5.

### **3.12.3 Análisis de los productos por autoradiografía**

Las muestras del punto anterior se sembraron en un gel SDS-PAGE 8%. Luego de la corrida, el gel se fijó durante 30 minutos en una mezcla 50% metanol, 10% ácido acético, 40% H<sub>2</sub>O, se incubó durante 5 minutos en una mezcla 7% ácido acético, 7% metanol, 1% glicerol, se enjuagó en DMSO y se incubó durante 3 horas en 20% 2,5-difenilazol (PPO) en DMSO. Se precipitó entonces el PPO mediante el agregado de H<sub>2</sub>O, se secó el gel (Gel dryer, modelo 543, BIO-RAD) y se lo expuso a una placa radiográfica durante 72 horas. Alternativamente, los productos fueron analizados mediante un escáner Storm 840 (Amersham Biosciences). En este caso no se les realizó el tratamiento con PPO/DMSO.

### 3.13 Esterificación de [<sup>14</sup>C]-palmitato y análisis de los productos mediante cromatografía en capa fina (TLC)

Se incubaron durante una hora 30 °C 300 µg de proteína total de microsomas de hepatopáncreas de *M. borellii* con [<sup>14</sup>C]-palmitato (0,2 µCi por tubo, Amersham Biosciences) en un buffer Tris-HCl 75 mM pH 7,4 que contuvo MgCl<sub>2</sub> 2mM, BSA 2 mg/ml, DTT 5mM, ATP 5 mM, CoASH 0,2 mM y glicerol-3-fosfato 20 mM en un volumen final de 0,35 ml (**condición experimental 1**) o en un buffer Tris-HCl 75 mM pH 7.4 que contuvo MgCl<sub>2</sub> 4mM, BSA 2 mg/ml, DTT 1mM, ATP 5mM, CoASH 0,2mM y 0,8mM de glicerol-3-fosfato en un volumen final de 0,2 ml (**condición experimental 2**). Las incubaciones se realizaron en presencia o ausencia de glicerol-3-fosfato. La extracción de lípidos totales se realizó mediante el procedimiento de Folch (Folch J y col, 1957). Los productos de la reacción se analizaron mediante TLC, utilizando placas de vidrio de 20 x 20 cm de silicagel G como fase estacionaria y un sistema de solventes hexano-eter etílico- ácido acético (80:20:1.5 v/v) como fase móvil. La radiactividad de cada mancha se cuantificó mediante el escáner Storm 840 (Amersham, Biosciences).

# **CAPÍTULO 4**

**El hepatopáncreas de  
*Macrobrachium borellii*  
expresa una GPAT  
mitocondrial homóloga a  
la descrita en el hígado  
de mamíferos**





## 4.1 INTRODUCCIÓN

El hepatopáncreas es uno de los órganos más versátiles del tracto digestivo de los crustáceos del orden Decapoda, ya que cumple funciones tan diversas como la síntesis y secreción de enzimas digestivas, la digestión y absorción de productos de la dieta, el almacenamiento de minerales y sustancias orgánicas, la detoxificación de xenobióticos, el metabolismo de hidratos de carbono y lípidos y la movilización de materiales de reserva durante el ciclo de muda (Ceccaldi HJ, 1989). Todas estas funciones son llevadas a cabo por el hígado, páncreas, intestino y tejido adiposo en los mamíferos.

Desde el punto de vista anatómico, consiste en un par de glándulas ubicadas a cada lado del estómago que ocupan un gran volumen dentro del cefalotórax (Ceccaldi HJ, 1989) y que constituyen entre un 2 a un 6% del peso corporal total.

Cada una de estas mitades se conecta con el tubo digestivo mediante un ducto principal; estos ductos a su vez se ramifican en ductos secundarios y terciarios, los que terminan en pequeños túbulos que constituyen la masa glandular. Tapizan estos túbulos distintos tipos de células: células E (embrionarias), F (fibrilares), R (reabsortivas) y B ( "blister-like").

Las células embrionarias (E) son cúbicas, poseen escasas organelas y tienen una elevada relación núcleo/citoplasma. Frecuentemente se encuentran en mitosis y se ha propuesto que dan origen a las células R (Ceccaldi HJ, 1989). Las células R son las más abundantes y tienen en su extremo apical un borde en cepillo muy desarrollado y abundantes mitocondrias. Además poseen un retículo endoplasmático liso muy abundante rodeando al núcleo y una gran vacuola supranuclear que almacena minerales como cobre, zinc y azufre. (Ceccaldi HJ, 1989; Sousa LG y col, 2005). Además, son características las inclusiones de glucógeno

y las gotas de lípidos. Estas características ultraestructurales son compatibles con la función absorbiva que presenta este tipo de célula.

Las células F presentan la morfología típica de una célula secretora: citoplasma basofílico con un alto contenido de retículo endoplasmático rugoso y aparato de Golgi muy desarrollado y son las responsables de la síntesis de enzimas digestivas (Ceccaldi HJ, 1989). Por el contrario, las células B maduras presentan un complejo endocítico apical y una gran vacuola central que finalmente protruye hacia el ducto provocando una secreción holocrina de sus componentes. Estas células están involucradas en la absorción de componentes digestivos presentes en el ducto, al los que endocita, procesa y luego vuelve a excretar como productos de desecho.

Los organismos de agua dulce se caracterizan por vivir en ambientes en los cuales los suministros energéticos varían considerablemente en poco tiempo; por ejemplo, una sequía o una helada pueden hacer peligrar la disponibilidad de alimentos. En este sentido, el hepatopáncreas cumple una función análoga a la que cumple el tejido adiposo de los mamíferos, acumulando TG que pueden ser movilizados ante condiciones de ayuno o estrés (Pollero RJ y col, 1990; SanchezPaz y col, ).

Utilizando como modelo al camarón de agua dulce *Macrobrachium borellii* se demostró que el hepatopáncreas es un órgano muy activo en la síntesis de TG. En la estación invernal, los TG alcanzan valores de hasta un 80% de los lípidos totales presentes en este órgano y este porcentaje se modifica según el ciclo sexual del animal (Gonzalez-Baro MR y Pollero RJ, 1988). Además, las incubaciones *in vivo* con [<sup>14</sup>C]-palmitato demostraron que el hepatopáncreas es uno de los órganos que capta más activamente a este ácido graso radiactivo, al que esterifica mayoritariamente como TG (Gonzalez-Baro MR y Pollero RJ,

1993). Resultados similares se obtuvieron al incubar microsomas de hepatopáncreas con [ $^{14}\text{C}$ ]-palmitato. En estos experimentos se demostró que también el ácido graso se esterifica *in vitro* como TG (Gonzalez-Baro MR y Pollero RJ, 1993).

Si bien se ha descrito actividad acil-CoA sintetasa tanto en microsomas (Gonzalez-Baro y col, 1990) como en mitocondrias (Lavarias S y col, 2006) de hepatopáncreas de *M. borellii*, la información con respecto a otras enzimas del metabolismo de glicerolípidos en invertebrados es muy limitada. Se hipotetizó entonces que, si la compartimentación de la síntesis de glicerolípidos es un proceso conservado en la evolución, debe existir entonces un actividad GPAT mitocondrial que inicie la síntesis de TG en el hepatopáncreas, así como ocurre en el hígado de mamíferos (Gonzalez-Baro y col, 2007).

## 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Teniendo en cuenta el rol preponderante del hepatopáncreas de *M. borelli* en la síntesis de TG, el objetivo del trabajo presentado en el presente capítulo fue caracterizar en forma general la actividad glicerol-3-fosfato aciltransferasa presente en este órgano, con el objetivo de compararla con la descrita en tejidos de mamífero.

## 4.3 RESULTADOS

### 4.3.1 Caracterización de las fracciones subcelulares de hepatopáncreas de *M. borellii*.

Se aislaron distintas fracciones subcelulares a partir de hepatopáncreas y con el objetivo de determinar la pureza de las mismas se midió la actividad de enzimas marcadoras de cada fracción.

Como es usual en tejidos de mamífero, se midió la actividad arilesterasa en microsomas, como marcadora de retículo endoplasmático (Shephard EH y Hubscher G, 1969). En la Tabla 4.1 se puede ver que esta actividad se enriqueció en microsomas 3,5 veces con respecto al homogenato, lo que demuestra que en esta especie de crustáceo existe alguna enzima microsomal asociada a la detoxificación análoga a la existente en el hígado de mamífero. Por el contrario, no se detectó actividad arilesterasa en la fracción mitocondrial.

También se midió la actividad citocromo c oxidasa, marcadora de membrana mitocondrial interna. Esta actividad se enriqueció 21,3 veces en la fracción mitocondrial con respecto al homogenato, mientras que en la fracción microsomal el enriquecimiento fue de solo 1,4 veces.

Estos resultados demostraron que las distintas fracciones subcelulares obtenidas mostraron niveles muy bajos o despreciables de contaminación cruzada, lo que las hace adecuadas para el estudio de la localización subcelular de la actividad glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT).

#### **4.3.2 La actividad GPAT se enriqueció en mitocondrias y no en microsomas.**

Se midió la actividad GPAT en las distintas fracciones subcelulares de hepatopáncreas (Figura 4.1). Sorpresivamente, esta actividad se enriqueció únicamente en la fracción mitocondrial (14 veces con respecto al homogenato), mientras que el enriquecimiento en microsomas fue comparable al obtenido con la enzima marcadora mitocondrial citocromo c oxidasa (1,5 veces).

Pensando en una posible inactivación por congelamiento de una hipotética isoenzima microsomal, las medidas de actividad se realizaron utilizando muestras frescas. Los resultados obtenidos en este caso fueron

**Tabla 4.1.** Actividad de enzimas marcadoras en las distintas fracciones subcelulares de hepatopáncreas.

	Citocromo c oxidasa		Ariesterasa	
	Actividad (mU/mg)	Enriquecimiento	Actividad ( $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ )	Enriquecimiento
Homogenato	8,5 $\pm$ 1,9	-	148 $\pm$ 16	-
Mitocondrias	181 $\pm$ 14	21,3	-	-
Microsomas	11,9 $\pm$ 1,0	1,4	519 $\pm$ 32	3,5

**Tabla 4.1** Se muestran las actividades específicas de las enzimas marcadoras citocromo c oxidasa y ariesterasa en las distintas fracciones subcelulares de hepatopáncreas. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  desvío estándar de tres experimentos independientes. El enriquecimiento se calculó en relación al homogenato.

similares a los presentados en la Figura 4.1, descartando entonces una inactivación por congelamiento.

Mediante el análisis de los productos de la reacción por cromatografía en capa fina (TLC) se determinó que el principal producto de esterificación mitocondrial fue el ácido lisofosfatídico (56,1% de la radiactividad incorporada) aunque también se detectaron diacilgliceroles (11,5 %) y triacilgliceroles (32,4 %) (Figura 4.2).

#### **4.3.3 La GPAT mitocondrial tiene preferencia por los ácidos grasos saturados, es resistente al tratamiento con N-etilmaleimida y se activa cuando se incuban las mitocondrias con polimixina B.**

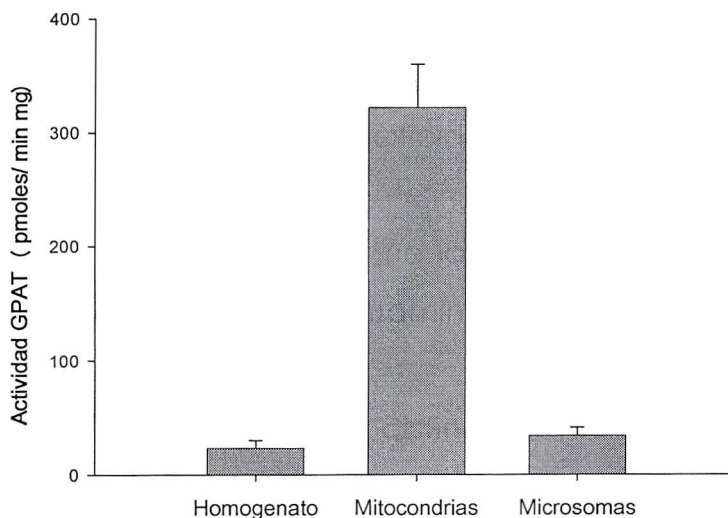
Se determinó la especificidad de sustrato utilizando palmitoil-CoA y oleoil-CoA como ejemplo de un ácido graso saturado y monoinsaturado, respectivamente. El sustrato preferido por la GPAT mitocondrial fue el palmitoil-CoA, ya que la velocidad máxima cuando se utilizó este sustrato

resultó ser aproximadamente cuatro veces mayor que cuando se utilizó oleoil-CoA (Figura 4.3, A).

Similar a lo que ocurre con otras enzimas de membrana (Coleman RA y col, 1992), el palmitoilCo-A ejerce un efecto inhibitorio de la actividad a altas concentraciones, mientras que el oleoil-CoA no exhibió este efecto inhibitorio, aún a concentraciones tan altas como 120  $\mu$ M.

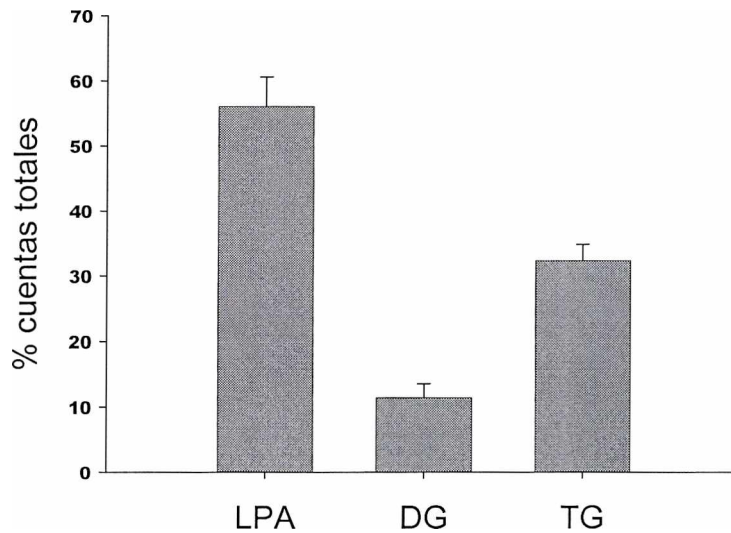
Los mismos experimentos se realizaron utilizando microsomas y se obtuvo el mismo perfil de especificidad, solo que las actividades específicas fueron significativamente menores (Figura 4.3, B). Estos resultados apoyan la hipótesis de que la actividad GPAT detectada en microsomas corresponde a una contaminación mitocondrial.

**Figura 4.1** Actividad GPAT en las distintas fracciones subcelulares de hepatopáncreas.



**Figura 4.1.** Se midió la actividad GPAT (pmol / min mg) de las distintas fracciones subcelulares de hepatopáncreas. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  desvío estándar de tres experimentos independientes

**Figura 4.2** El principal producto de la reacción GPAT mitocondrial fue el ácido lisofosfatídico (ALF)

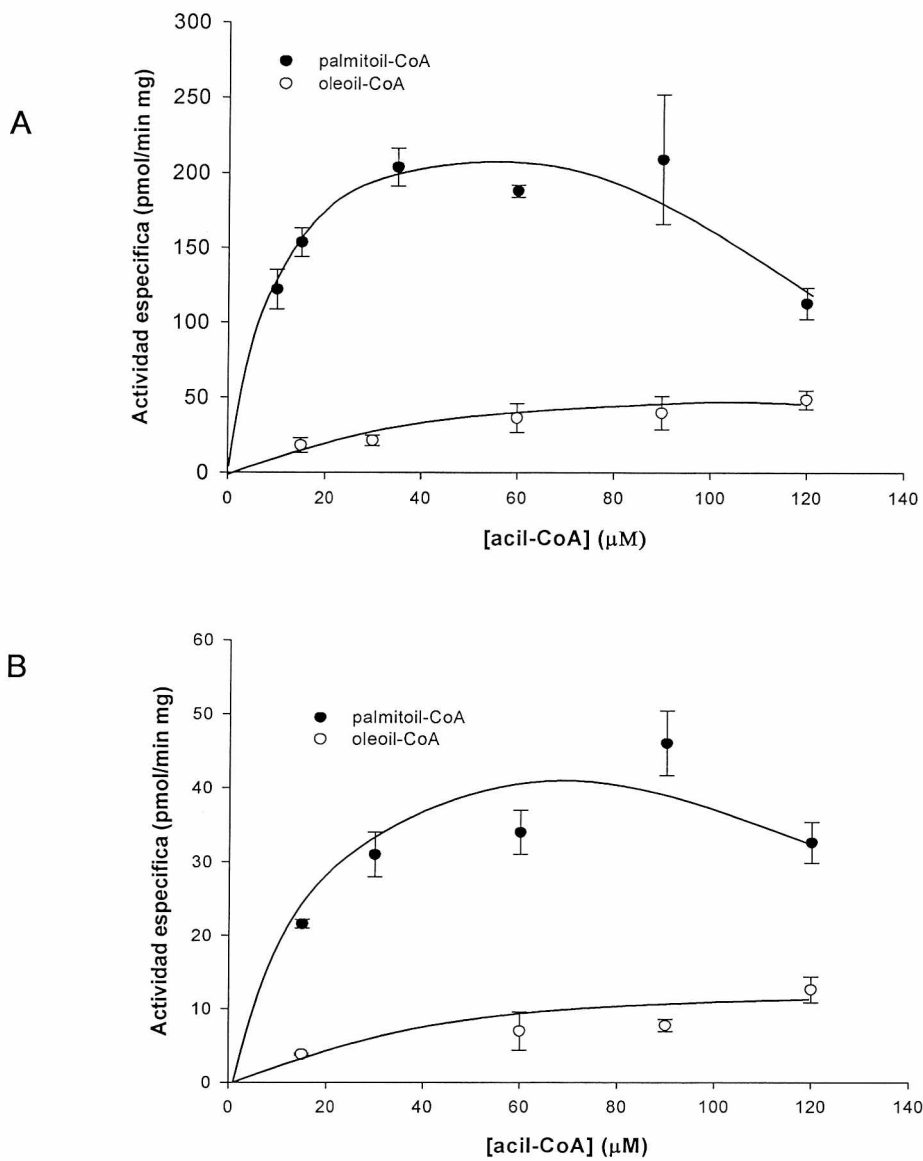


**Figura 4.2** Los lípidos sintetizados por las mitocondrias a partir de [ $^{14}\text{C}$ ]-glicerol-3-fosfato se extrajeron y analizaron mediante TLC en un sistema hexano-eter etílico-ácido acético (80:20:1.5 v/v). La radiactividad se cuantificó mediante un escáner Storm 840. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes.

Como se muestra en la Figura 4.4, la actividad GPAT mitocondrial fue resistente al tratamiento con N-etilmaleimida (NEM), un reactivo que reacciona con grupos sulfhidrilo, aún a una concentración de 10 mM. Los microsomas tratados con NEM, presentaron la misma actividad específica que la reportada en la figura 4.1, por lo que en este compartimento subcelular tampoco se detectó actividad NEM sensible.

La actividad GPAT mitocondrial resultó notablemente estimulada cuando se preincubaron las mitocondrias con polimixina B, un antibiótico que modifica la fluidez de la membrana. A una concentración de 0,5 mg/ml se produce un incremento de aproximadamente tres veces en la actividad específica (Figura 4.4).

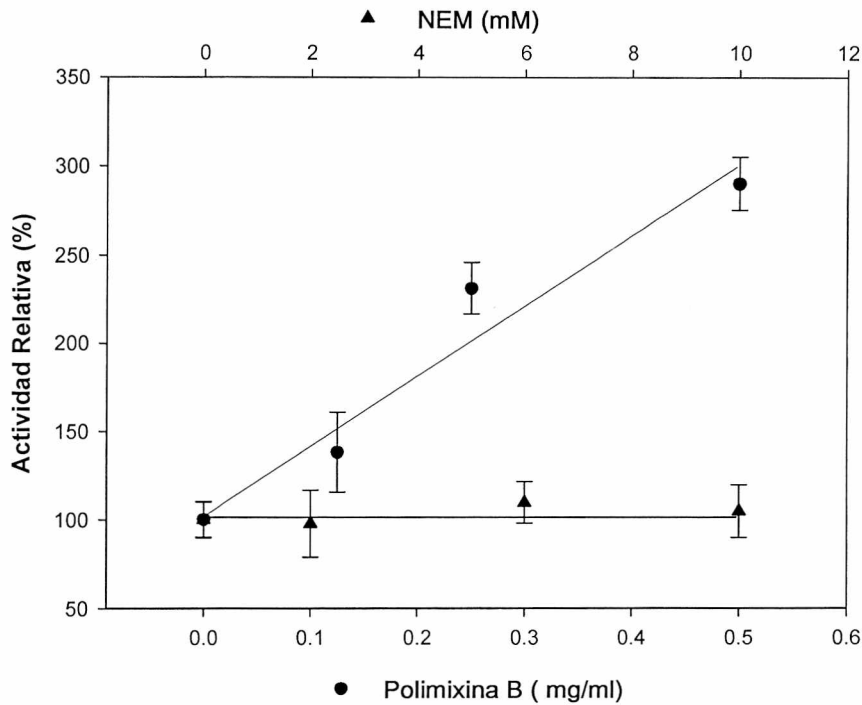
**Figura 4.3** Especificidad de sustrato acil-CoA de la GPAT.



**Figura 4.3** Se midió la actividad GPAT de mitocondrias (A) y microsomas (B) de hepatopáncreas en función de la concentración de acil-CoAs. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes.



**Figura 4.4** Efecto de N-etilmaleimida y polimixina B en la actividad GPAT mitocondrial.



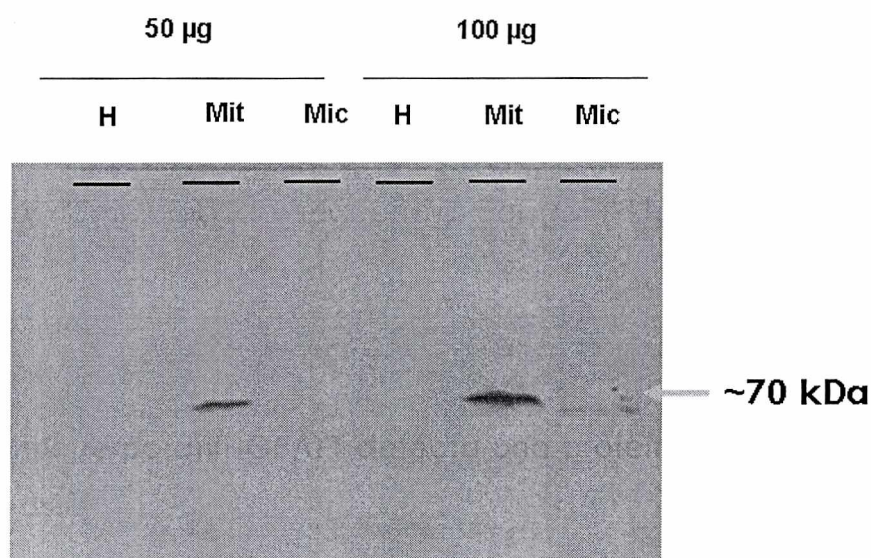
**Figura 4.4.** Se midió la actividad GPAT en mitocondrias de hepatopáncreas previamente incubadas con NEM (▲) o con polimixina B (●). Los resultados se expresan como actividad relativa porcentual y son representativos de dos experimentos independientes.

**4.3.4 Las mitocondrias de hepatopáncreas presentan una proteína reactiva al anticuerpo anti-GPAT1.**

Las proteínas totales de homogenato, mitocondrias y microsomas de hepatopáncreas (separadas en SDS-PAGE 8% y transferidas a membranas PVDF) se incubaron con un anticuerpo policlonal anti-GPAT1 que reconoce la enzima GPAT1 de rata. En las calles donde se sembraron las proteínas mitocondriales, este anticuerpo detecta una única proteína de aproximadamente 70 kDa (Figura 4.5). En el caso de los microsomas, solo se detectó esta banda cuando se sembraron 100 µg de proteína total, aunque la intensidad de la misma fue muy baja.

Este resultado sugiere que existe una proteína mitocondrial de 70 kDa que tiene homología de secuencia con GPAT1 y su expresión es coherente con la actividad GPAT NEM resistente medida en cada fracción subcelular.

**Figura 4.5 El anticuerpo anti-GPAT1 detecta una proteína mitocondrial de hepatopáncreas.**



**Figura 4.5.** Se sembraron en un gel SDS-PAGE 10% 50 o 100 µg de proteína total proveniente de homogenato (H), mitocondrias (Mit) y microsomas (Mic) de hepatopáncreas. Luego de la separación electroforética, las proteínas se transfirieron a membranas PVDF y se incubaron con el anticuerpo anti-GPAT1. El revelado se realizó por quimioluminiscencia.

**4.3.5 Los microsomas de hepatopáncreas esterifican [<sup>14</sup>C]-palmitato en ausencia de glicerol-3-fosfato.**

Previamente se ha reportado que los microsomas de hepatopáncreas de *M. borelli* esterifican [<sup>14</sup>C]-palmitato principalmente como TG (Gonzalez-Baro MR y Pollero RJ, 1993). Teniendo en cuenta que no se detectó actividad GPAT en la fracción microsomal, o más específicamente, que la actividad detectada fue compatible con una

contaminación mitocondrial, es poco probable que el palmitato sea incorporado en TG vía síntesis *de novo*. Para comprobar esta hipótesis, se hicieron experimentos en presencia o ausencia de G3P; los mismos se realizaron en distintas condiciones experimentales: la condición experimental 1 corresponde a la mezcla utilizada en el trabajo reportado previamente mientras que la condición experimental 2 corresponde a la mezcla utilizada para medir la actividad GPAT *in vitro* (Tabla 4.2).

**Tabla 4.2.** Medio de incubación de microsomas con [<sup>14</sup>C]-palmitato

	Condición experimental 1	Condición experimental 2
Tris-HCl pH 7,4	75 mM	75 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM	4 mM
BSA	2 mg/ml	2 mg/ml
DTT	5 mM	1 mM
ATP	5 mM	5 mM
CoASH	0,2 mM	0,2 mM
Volumen final	0,35 ml	0,2 ml

En la condición experimental 1 y en presencia de G3P, los microsomas esterifican el 53,7% del [<sup>14</sup>C]-palmitato adicionado al medio de reacción, mientras que en ausencia del mismo se esterifica un 40,1% (Tabla 4.3). Estas diferencias resultan estadísticamente significativas (prueba t,  $p < 0,01$ ), sin embargo los resultados demuestran que la esterificación ocurre mayoritariamente por una vía alternativa a la síntesis *de novo*. Las diferencias obtenidas en presencia y ausencia de G3P podrían indicar que este metabolito modularía la actividad de alguna

de las enzimas involucradas. La distribución de la marca incorporada es comparable en ambos casos: el 80% se recupera en los lípidos neutros (siendo TG el lípido mayoritario con un 65% aproximadamente), mientras que alrededor de un 15% se incorpora en fosfolípidos. Además, el proceso es acil-CoA dependiente ya que no hay esterificación en ausencia de ATP y coenzima A.

Cuando se realizaron los mismos experimentos en la condición experimental 2, se esterificó un 27,8% del [<sup>14</sup>C]-palmitato en presencia de glicerol-3-fosfato y un 25,5% en ausencia del mismo; en este caso también la marca incorporada se distribuyó principalmente en lípidos neutros (92,3 y 88,8% respectivamente) pero los productos mayoritarios fueron los DG y no los TG (Tabla 4.3). En este caso, no se observaron diferencias significativas cuando el ensayo se realizó en presencia o ausencia de glicerol-3-fosfato.

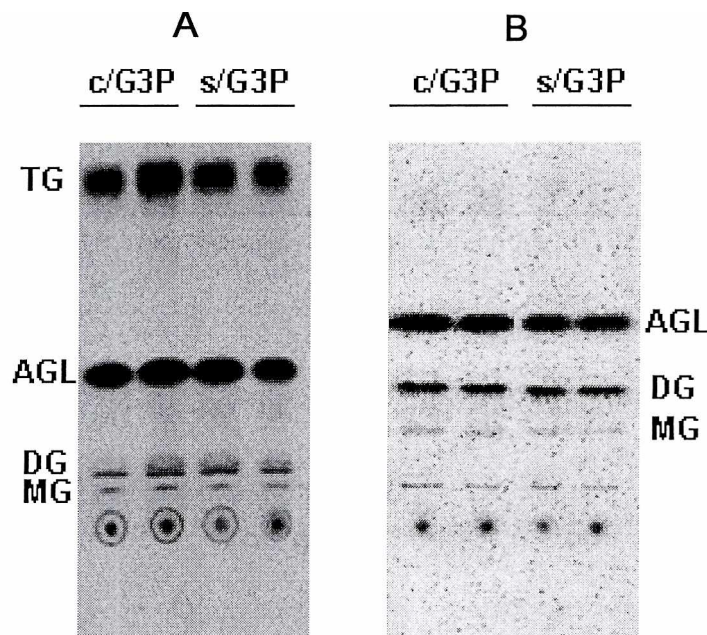
Las condiciones experimentales 1 y 2 difieren en las concentraciones de MgCl<sub>2</sub> y DTT. Como resulta evidente, una alta concentración de Mg<sup>++</sup> (4 mM) o una baja concentración de DTT (1 mM) en la condición experimental 2 impiden la conversión de diglicéridos en triglicéridos, pudiendo estar inhibidas las actividades de enzimas como la diacilglicerolaciltransfera o la diacilglicerol transacilasa. En la Figura 4.6 se muestra un experimento representativo en ambas condiciones experimentales.

**Tabla 4.3 Esterificación microsomal de [<sup>14</sup>C]-palmitato**

Condición experimental 1		
	c/ G3P	s/ G3P
% esterificación	53,7 ± 7,5	40,1 ± 2,2
TG+DG+MG <sup>a</sup>	83,8 ± 2,7	81,1 ± 7,3
FL	13,9 ± 4,2	18,4 ± 7,4
Condición experimental 2		
	c/ G3P	s/ G3P
% esterificación	27,8 ± 1,6	25,5 ± 4,1
DG+MG <sup>b</sup>	92,3 ± 8,6	88,8 ± 5,6
FL	7,7 ± 1,8	10,3 ± 5,0

**Tabla 4.3.** Se incubaron microsomas de hepatopáncreas de *M. borelli* con [<sup>14</sup>C]-palmitato y se midió la esterificación y distribución de la marca incorporada en presencia (C/G3P) o ausencia (S/G3P) de glicerol-3-fosfato. Los resultados se expresan como el promedio ± desvío estándar de tres experimentos independientes. TG: triacilgliceroles, DG: diacilgliceroles, MG: monoacilgliceroles, FL: fosfolípidos. <sup>a</sup> Aproximadamente el 65% corresponde a TG. <sup>b</sup> Aproximadamente el 85% corresponde a DG.

**Figura 4.6 Síntesis microsomal de glicerolípidos a partir de [<sup>14</sup>C]-pamitato.**



**Figura 4.6.** Se incubaron 300 µg de proteína total de microsomas de hepatopáncreas con [<sup>14</sup>C]-palmitato en presencia (c/G3P) o ausencia (s/G3P) de glicerol-3-fosfato en la condición experimental 1 (A) o en la condición 2 (B). Los productos de reacción se separaron mediante cromatografía en capa fina y se cuantificaron mediante un escáner STORM 840.

## 4.4 DISCUSIÓN

Para medir la actividad GPAT en fracciones subcelulares de hepatopáncreas de *M. borelli*, se escogió un método ampliamente utilizado en tejidos de mamífero (Gonzalez-Baro y col, 2001). En estas condiciones, en hígado de rata y ratón se detectan dos actividades: una microsomal sensible a reactivos que reaccionan con grupos sulfhidrilo como la N-etilmaleimida (NEM) y con igual preferencia por palmitoil-CoA y oleoil-CoA y una mitocondrial resistente al NEM y con preferencia por acil-CoAs saturados.

Sorprendentemente, en hepatopáncreas de *M. borellii* solo se detectó una actividad GPAT en la fracción mitocondrial. Esta actividad presentó características análogas a las descritas para la enzima GPAT1 de rata y ratón: es resistente al NEM, tiene preferencia por los acil-CoAs saturados y se activa en presencia de polimixina B (Coleman RA y Lee DP, 2004; Carroll MA y col, 1981). Sin embargo, la activación en presencia de este antibiótico es mucho más marcada que en mitocondrias de hígado de rata, sugiriendo que en este organismo la fluidez de la membrana puede ser un factor importante para regular la actividad GPAT.

Además, el anticuerpo anti-GPAT1 obtenido a partir de GPAT1 recombinante, reconoce una proteína de 70 KDa en la fracción mitocondrial. Estos resultados permiten suponer que existe una alta homología entre la GPAT1 de rata y la GPAT mitocondrial de *M. borellii*.

Al igual que en hígado de rata, cuando se incubaron mitocondrias de hepatopáncreas con [<sup>14</sup>C]-glicerol-3-fosfato, el principal producto fue el ácido lisofosfatítico (56,1%), pero también se obtuvieron diglicéridos y triglicéridos. Teniendo en cuenta que las preparaciones de mitocondrias no contienen contaminantes provenientes de retículo endoplasmático, estos resultados sugieren que la mitocondria podría por sí sola llevar a

cabo la síntesis *de novo* de triglicéridos, siendo la reacción catalizada por GPAT el paso limitante.

Numerosos resultados apoyan la hipótesis de que la actividad GPAT detectada en microsomas se debe a la contaminación mitocondrial. En primer lugar, el enriquecimiento en la fracción microsomal con respecto al homogenato de la actividad GPAT es igual al enriquecimiento de la actividad citocromo c oxidasa, enzima marcadora de mitocondrias. Además, la actividad detectada en microsomas presenta las mismas características que la actividad mitocondrial: preferencia por el sustrato palmitoil-CoA por sobre oleoil-CoA y resistencia al reactivo N-etilmaleimida (NEM); por último, se detecta una banda débil reactiva al anticuerpo anti-GPAT1 cuando se siembran 100 microgramos de proteína total microsomal.

Por lo tanto, se puede decir que en las condiciones de medida empleadas en el presente trabajo, no se detecta actividad GPAT en los microsomas de hepatopáncreas de *M. borellii*. Este resultado fue realmente inesperado, ya que en un trabajo previo se demostró que los microsomas de hepatopáncreas de *M. borellii* esterifican [<sup>14</sup>C]-palmitato, siendo TG el producto mayoritario (Gonzalez-Baro MR y Pollero RJ, 1993). En este trabajo, las incubaciones se realizaron en presencia de glicerol-3-fosfato y se planteó que la esterificación del ácido graso ocurría mediante síntesis *de novo*. Sin embargo, al no haber actividad GPAT en la fracción microsomal y al haber esterificación de [<sup>14</sup>C]-palmitato en ausencia de glicerol-3-fosfato, resulta evidente que este proceso ocurre por una vía alternativa. Teniendo en cuenta la función absortiva que cumple el hepatopáncreas y que se ha descrito actividad lipasa en las microvellosidades de las células R en otros crustáceos (Ceccaldi HJ, 1989) así como también en hepatopáncreas de *M. borellii* (Lavarias S, comunicación personal), se puede especular que la síntesis microsomal

de triglicéridos ocurriría en este órgano a través de la vía del monoacilglicerol descrita en el intestino de mamíferos.

La información en cuanto a la medición de actividad GPAT mitocondrial en invertebrados resulta muy limitada. En un trabajo publicado en 1976 (Megias A y col, 1976), se midió la esterificación de [ $^{14}\text{C}$ ]glicerol-3-fosfato en distintas fracciones subcelulares del insecto *Ceratitis capitata* en distintos estadios del desarrollo y se pudo demostrar que la mitocondria es capaz de sintetizar TG, aunque la principal actividad se localiza en microsomas. Los resultados reportados en este capítulo son originales, en cuanto a que es el único organismo en el que se ha descrito actividad GPAT únicamente en la fracción mitocondrial. Si bien no se ha clonado el gen que codifica para esta enzima, los resultados reportados en este trabajo permiten suponer que presenta una alta homología con la GPAT1 de mamíferos.

La presencia de una actividad GPAT mitocondrial conservada en la evolución biológica permite suponer que cumple una función importante en el metabolismo de glicerolípidos celulares.



# **CAPÍTULO 5**

**GPAT1 es inactiva en los  
sitios de contacto entre  
mitocondria y retículo  
endoplasmático**



## 5.1 INTRODUCCIÓN

Si bien el rol específico que cumple cada isoforma de la enzima glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT) en el metabolismo de glicerolípidos en células de mamífero no se conoce exactamente, numerosos estudios sugieren que GPAT1 iniciaría la síntesis de triglicéridos hepáticos (Gonzalez-Baro MR y col, 2007).

La localización de esta enzima en la membrana mitocondrial externa resulta asombrosa, teniendo en cuenta que las enzimas necesarias para convertir el ácido lisofosfatídico en triacilgliceroles se encuentran localizadas en el retículo endoplasmático.

En un sistema "redundante" como el que constituye la actividad GPAT en células de mamífero, en el sentido de que existen varias isoenzimas que catalizan la misma reacción, la localización subcelular y en particular la interacción con otras proteínas pueden resultar determinantes para la función específica que cumple cada una de ellas.

El sistema enzimático mitocondrial carnitina palmitoiltransferasa (CPT) permite la entrada de acilCoAs de cadena larga hacia la matriz mitocondrial, donde ocurre la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos (Bonfont JP y col, 2004). La enzima carnitina palmitoiltransferasa-I (CPT-I), el primer componente del sistema CPT, cataliza el paso limitante: la formación de acilcarnitina a partir de acil-CoA y carnitina. Esta enzima se localiza en la membrana mitocondrial externa y el producto de la reacción que cataliza es canalizado hacia la matriz mitocondrial a través de un transportador específico localizado en la membrana mitocondrial interna.

Se ha demostrado que cuando se sobreexpresa GPAT1 en hepatocitos de rata disminuye la  $\beta$ -oxidación (Lewin TM y col, 2005; Linden D y col, 2004) mientras que los ratones *knockout* para GPAT1 tienen dicha vía metabólica incrementada (Hammond LE y col, 2002).

Estos resultados junto con otros reportados previamente (Beauseigneur F y col, 1999) sostienen la hipótesis de que GPAT1 competiría con CPT-I por los acil-CoAs disponibles. De esta manera, los primeros pasos de la oxidación de ácidos grasos y síntesis de triglicéridos estarían regulados de forma recíproca.

En cuanto a los acilCoAs que alimentan estas vías metabólicas, se sabe que en mamíferos existen isoformas de acilCoA sintetasa de ácidos grasos de cadena larga (ACSL) que presentan distinta localización subcelular e incluso su expresión resulta diferencial en los distintos tejidos (Coleman RA y col, 2002). Al respecto, la única isoforma de acilCoA sintetasa presente en mitocondrias de hígado de rata es la acilCoA sintetasa-5 (ACSL5). Si bien originalmente se planteó la hipótesis de que ACSL5 activaría a los ácidos grasos para su posterior oxidación mitocondrial, estudios de sobreexpresión demostraron que ACSL5 activa ácidos grasos que finalmente forman parte del pool de TAG de reserva (Mashek DG y col, 2006). De esta manera, ACSL5 podría sintetizar el sustrato para la reacción catalizada por GPAT1.

Cuando se estudió la localización submitocondrial de CPT-I se encontró que se encuentra enriquecida en los sitios de contacto que existen entre la membrana mitocondrial externa e interna (Fraser F y Zammit VA, 1998; Hoppel C y col, 2001). La existencia de estos sitios de contacto ha sido documentada por numerosos estudios ultraestructurales (Franke WW y col, 1971; Ardail D y col, 1991; Cascarano J y col, 1982; Lewis JA y Tata JR, 1973; Meier PJ y col, 1981; Shore GC y Tata JR, 1977; Mannella CA y col, 1998) y además se han descrito distintas técnicas que permiten obtenerlos experimentalmente (Ardail D y col, 1993; Hoppel C y col, 2002). Se ha involucrado a los sitios de contacto en procesos tan diversos como el tráfico de proteínas, la fusión y fisión mitocondrial, el transporte de ciertos metabolitos y la interacción con el

citoesqueleto entre otros (Brdiczka DG y col, 2005; Reichert AS y col, 2002). Además, se ha demostrado que los sitios de contacto forman junto con zonas de retículo endoplasmático (RE) asociadas a los mismos, microdominios estructurales y funcionales que facilitan la importación de fosfolípidos (Daum G y Vance JE, 1997; Ardail D y col, 1991). Desde el punto de vista del transporte de ácidos grasos hacia el interior de la mitocondria, tanto CPT-I como CPT-II se hallan enriquecidas en los sitios de contacto, lo que facilitaría el transporte de acilCoAs desde el citosol hacia la matriz mitocondrial. Además de las enzimas mencionadas, también se ha descrito el enriquecimiento en sitios de contacto de una ACSL, aunque no se ha identificado la isoforma (Hoppel C y col, 2001).

En base a estos resultados, se planteó la hipótesis de que GPAT1 podría formar en los sitios de contacto, un complejo multienzimático junto con CPTI y/o ACSL5, que controlaría el metabolismo de acilCoAs en la membrana mitocondrial externa.

## **5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

El objetivo del trabajo presentado en este capítulo fue estudiar la localización submitocondrial de GPAT1 y poner en evidencia una posible interacción proteína-proteína con la enzima carnitina-palmitoiltransferasa-I (CPTI) y/o con la enzima acilCoA sintestasa 5 (ACSL5).

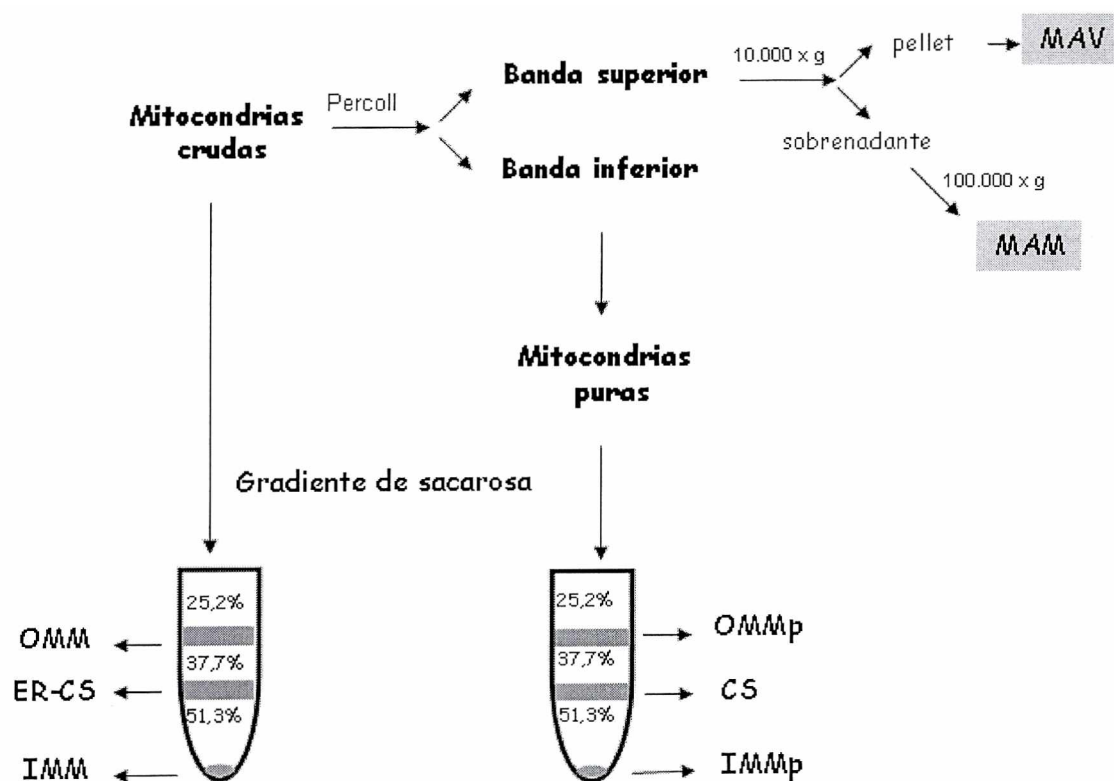
## **5.3 RESULTADOS**

### **5.3.1 La actividad GPAT1 no concuerda con la expresión de la proteína en las distintas fracciones subcelulares de hígado de rata**

Para llevar a cabo el estudio de localización submitocondrial de GPAT1 se escogió un método de purificación de mitocondrias de hígado de rata descrito previamente (Hovius R y col, 1990; Vance JE, 1990).

Además de las mitocondrias crudas y de las fracciones resultantes de su purificación (mitocondrias puras, MAV "mitochondrial associated vesicles" y MAM "mitochondrial associated membranes"), se obtuvieron muestras de homogenato post-nuclear y microsomas. A su vez, el fraccionamiento submitocondrial se realizó partir de mitocondrias tanto puras como crudas. Cuando se utilizaron como material de partida mitocondrias crudas, las subfracciones obtenidas fueron: membrana mitocondrial externa (OMM), sitios de contacto (ER-CS) y membrana mitocondrial interna (IMM). Cuando se partió de mitocondrias puras, las fracciones fueron: membrana mitocondrial externa (OMMp), sitios de contacto (CS) y membrana mitocondrial interna (IMMp). (Ver Figura 5.1).

**Figura 5.1. Obtención de fracciones subcelulares y submitocondriales de hígado de rata**



Las distintas fracciones fueron caracterizadas mediante el ensayo de la actividad de enzimas marcadoras (Tabla 5.1) o mediante western blot (Figura 5.2). La proteína marcadora de membrana mitocondrial externa, el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), (Figura 5.2) y la actividad citocromo c oxidasa marcadora de membrana mitocondrial interna (Tabla 5.1) se enriquecieron en las mitocondrias puras con respecto a las mitocondrias crudas, lo que demuestra la eficiencia del proceso de purificación. Además, la ausencia de los marcadores de retículo endoplasmático: la actividad arilesterasa y la proteína GRP78 en las mitocondrias puras permite concluir que las membranas asociadas a mitocondrias (MAM) de origen reticular fueron removidas en el proceso de purificación. La presencia de la proteína marcadora fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa 2 (PEMT2) en la fracción MAM corrobora la identidad de la misma (Stone SJ y Vance JE, 2000). Además, se puede observar que la actividad arilesterasa presente en las mitocondrias crudas se recupera en la fracción MAM. Como era de esperar, la actividad arilesterasa y la cantidad de GRP78 son máximas en la fracción microsomal.

En el procedimiento de purificación de mitocondrias empleado en el presente trabajo se obtuvo una fracción denominada MAV ("mitochondrial associated vesicles"), centrifugando la banda superior del tubo de Percoll a 10.000 x g durante 10 minutos (Figura 5.1). Mediante microscopía electrónica se pudo establecer que esta fracción no contiene mitocondrias y que consiste en grandes vesículas de aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$  de diámetro. (Figura 5.3).

En cuanto a la naturaleza bioquímica de la fracción MAV se determinó que contiene marcadores de membrana mitocondrial externa e interna así como también de retículo endoplasmático (Tabla 5.1, Figura 5.2).

**Tabla 5.1. Enriquecimiento de la actividad de enzimas marcadoras y actividad GPAT con respecto al homogenato de hígado de rata**

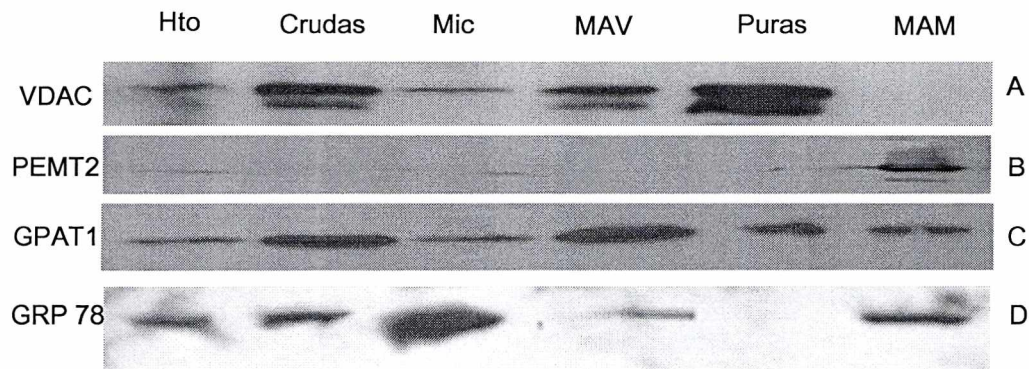
	Arilesterasa	Citocromo c oxidasa	GPAT NEM- resistente	GPAT NEM- sensible
Crudas	0.36 ± 0.06	1	2.0 ± 0.4	0.80 ± 0.10
Microsomas	1.70 ± 0.30	0.19 ± 0.02	0.29 ± 0.06	1.50 ± 0.20
MAV	0.29 ± 0.07	1,6 ± 0.02	2,60 ± 0.10	0.74 ± 0.02
Puras	ND	2,70 ± 0.50	4.40 ± 0.20	ND
MAM	1.20 ± 0.40	ND	1.30 ± 0.30	1.60 ± 0.30

La actividad citocromo c oxidasa se normalizó con respecto a la actividad en mitocondrias crudas ( $0,045 \pm 0,015$  U/mg). Los resultados representan el promedio  $\pm$  desvío estándar de tres fraccionamientos independientes. Las actividades específicas para el homogenato fueron: arilesterasa  $0,95 \pm 0,24$  mmol/min mg, GPAT NEM resistente  $0,28 \pm 0,08$  nmol/min mg y GPAT NEM sensible  $0,40 \pm 0,06$  nmol/min mg. ND: no detectable.

¿Cómo se distribuye la actividad y expresión de GPAT1 en las distintas fracciones? La actividad específica GPAT NEM resistente (GPAT1) fue máxima en las mitocondrias puras, como era de esperar para una proteína localizada en la membrana mitocondrial externa. Sin embargo, en todos los fraccionamientos realizados se pudo constatar que la expresión de la proteína no es máxima en las mitocondrias puras sino en la fracción MAV. En la Figura 5.4 se muestran las cantidades relativas de proteína y la actividad enzimática obtenidas en las fracciones MAV y mitocondrias puras en tres fraccionamientos independientes.

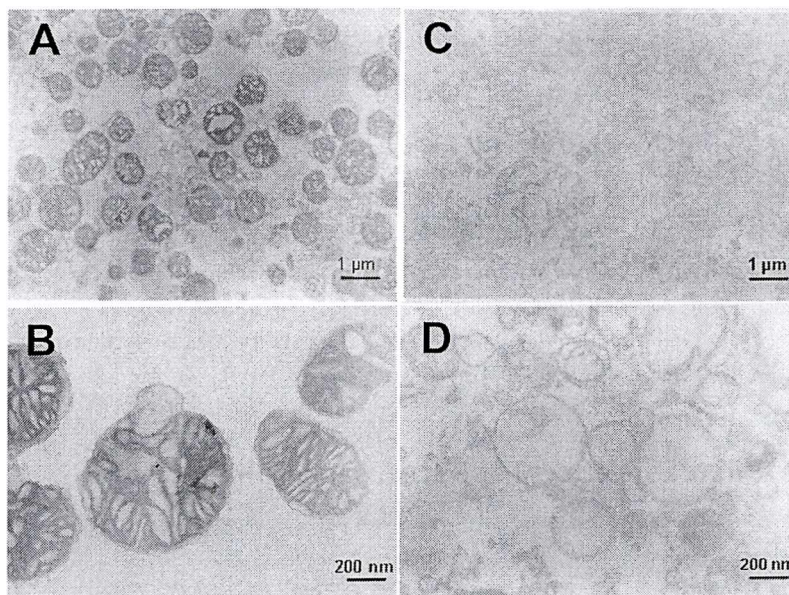


**Figura 5.2** Caracterización de las fracciones subcelulares de hígado de rata mediante western blot.



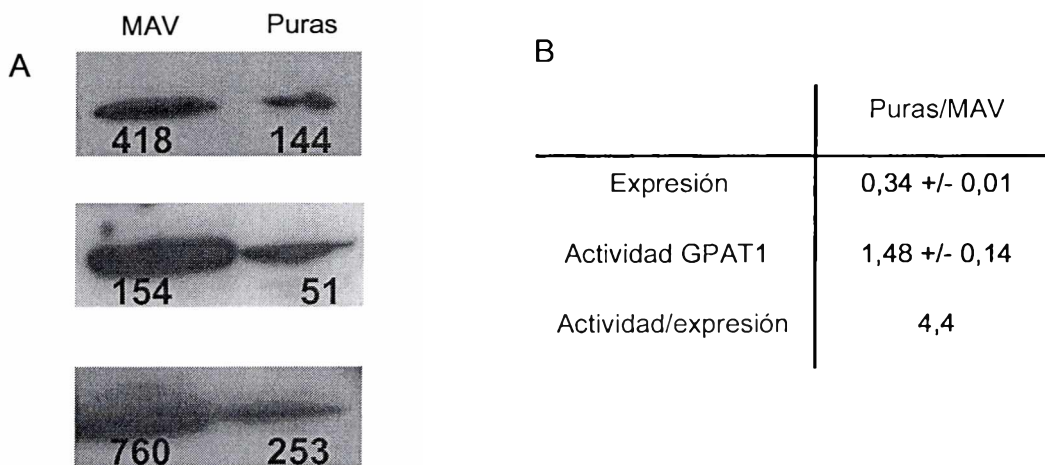
**Figura 5.2.** Se sembraron 50  $\mu$ g de proteína total de cada fracción subcelular en geles SDS-PAGE 12% (A y B) u 8% (C y D). Panel A: incubado con anticuerpo anti-VDAC. Panel B: incubado con anticuerpo anti-PEMT2. Panel C: incubado con anticuerpo anti-GPAT1. Panel D: incubado con anticuerpo anti-GRP78. Hto, homogenato postnuclear; Crudas, mitocondrias crudas; Mic, microsomas; MAV, pellet de 10000 x g de la banda superior del tubo de Percoll; Puras, mitocondrias puras; MAM, pellet de 100000 x g del sobrenadante de MAV. Los resultados son representativos de al menos cinco fraccionamientos independientes.

**Figura 5.3.** Micrografías electrónicas de las fracciones mitocondrias puras y MAV



**Figura 5.3** Mediante microscopía electrónica se visualizaron las mitocondrias puras (A y B) y la fracción MAV (C y D)

**Figura 5.4 Actividad y expresión de GPAT1 en mitocondrias puras y fracción MAV.**



**Figura 5.4 A** Se cuantificó mediante western blot la expresión de GPAT1 en la fracción MAV y en mitocondrias puras. **B** Actividad y expresión de GPAT1 en mitocondrias puras relativas a MAV.

La actividad GPAT relativa a la expresión resultó 4,4 veces mayor en las mitocondrias puras con respecto a MAV. Esta discrepancia entre actividad y expresión también se pone de manifiesto al comparar las fracciones mitocondrias puras y crudas. La actividad específica GPAT1 en mitocondrias puras resultó ser aproximadamente el doble que en las mitocondrias crudas (Tabla 5.1), en concordancia con la expresión del marcador de OMM VDAC (Figura 5.2, panel A). Sin embargo, la expresión de GPAT1 (medida como intensidad de la banda reactiva al anticuerpo antiGPAT1) (Figura 5.2, panel C) en mitocondrias puras y crudas fue comparable.

Cabe destacar que la fracción MAM presenta tanto actividad GPAT NEM resistente como proteína reactiva al anticuerpo antiGPAT1. La presencia de GPAT1 en la fracción MAM parece no deberse a una contaminación de la misma con OMM, ya que no se detecta la proteína VDAC.

### **5.3.2 Los sitios de contacto asociados a retículo endoplasmático obtenidos a partir de mitocondrias crudas expresan un pool de GPAT1 menos activo**

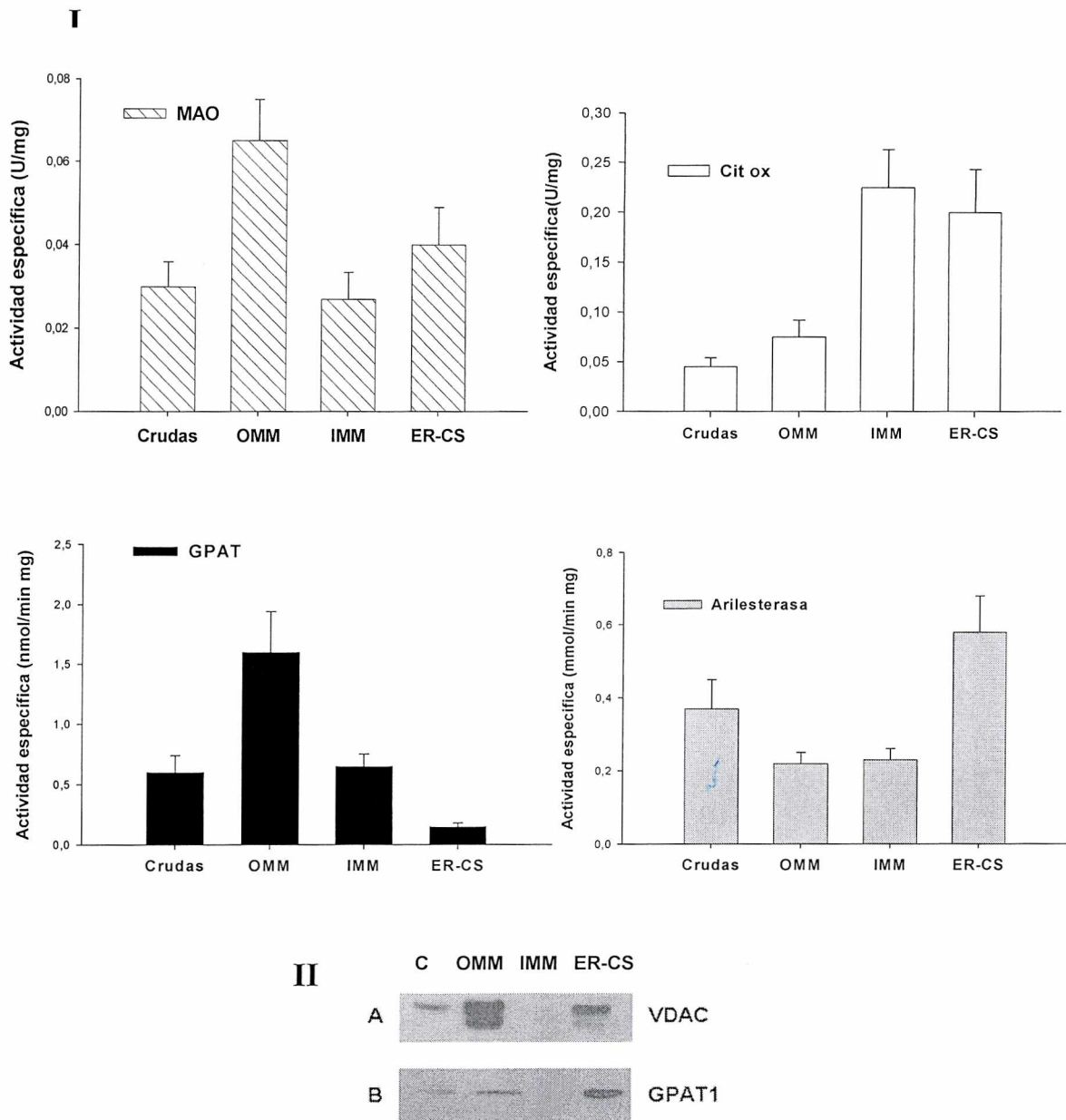
Se obtuvieron fracciones submitocondriales a partir de mitocondrias crudas y puras mediante un procedimiento descrito previamente (Hoppel C y col, 2002); se utilizó un gradiente discontinuo de sacarosa del que se obtuvieron tres fracciones submitocondriales (Figura 1). La banda de menor densidad recogida en la interfase 25,2%-37,7% se enriquece en membrana mitocondrial externa, mientras que el pellet en el fondo del tubo se enriquece en membrana mitocondrial interna. En la interfase 37,7%-51,3% se recoge una banda de densidad intermedia que corresponde a los sitios de contacto entre membrana mitocondrial externa e interna.

En este trabajo se aplicó este procedimiento utilizando como material de partida tanto mitocondrias crudas como puras. Las fracciones obtenidas a partir de mitocondrias crudas se denominaron (en orden creciente de densidad): OMM, ER-CS e IMM mientras que las obtenidas a partir de mitocondrias puras se denominaron OMMp, CS e IMMp. (Ver Figura 5.1).

Como era de esperar, los marcadores de membrana mitocondrial externa VDAC y la actividad monoamino oxidasa (Figuras 5.5 y 5.6, I y II) se enriquecieron en las fracciones OMM y OMMp con respecto a mitocondrias crudas y puras respectivamente, mientras que el marcador de membrana interna citocromo c oxidasa se enriqueció en la fracción IMM e IMMp.

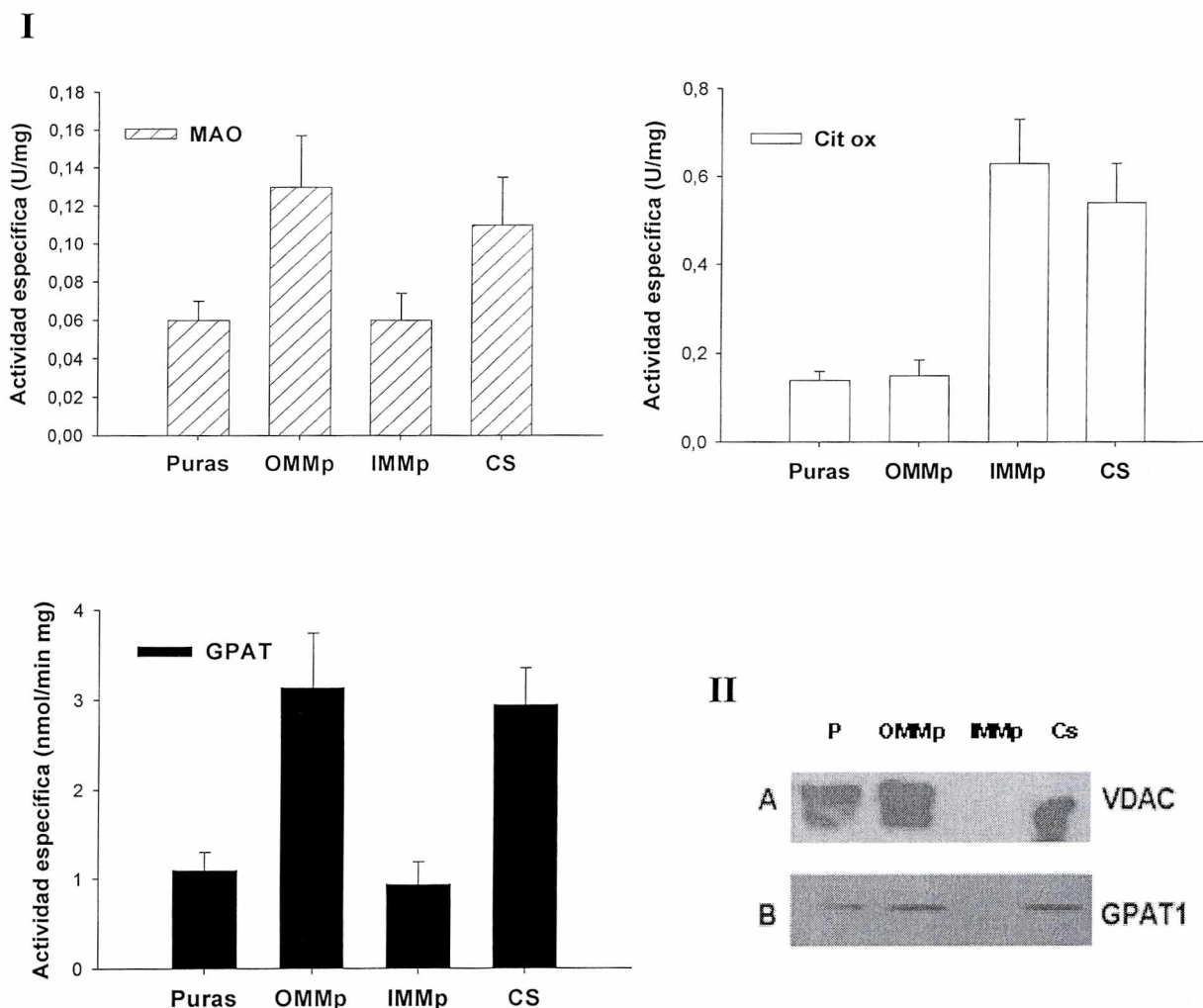
Los sitios de contacto ER-CS y CS presentaron tanto marcadores de membrana mitocondrial externa como interna (Figuras 5.5 y 5.6). La medición de la actividad arilesterasa (Figura 5.5) permitió demostrar que el componente de retículo endoplasmático presente en las mitocondrias

**Figura 5.5** Expresión y actividad de GPAT1 en mitocondrias crudas y sus fracciones.



**Figura 5.5. I** Se midió la actividad monoamino oxidasa (MAO), citocromo c oxidasa (cit ox), arilesterasa y GPAT NEM resistente (GPAT) en mitocondrias crudas (crudas) y en las fracciones submitocondriales obtenidas a partir de las mismas (OMM, IMM y ER-CS). Los valores representan el promedio  $\pm$  desvío estándar de tres fraccionamientos independientes. **II** Se sembraron 50  $\mu$ g de proteína total de mitocondrias crudas (C) y sus fracciones (OMM, IMM y ER-CS) en geles 8% (panel A) o 12% (panel B). Las proteínas se transfirieron a membranas PVDF y se reveló con anticuerpos anti-VDAC y anti-GPAT1.

**Figura 5.6** Expresión y actividad GPAT1 en mitocondrias puras y sus fracciones



**Figura 6.** **I** Se midió la actividad monoamino oxidasa (MAO), citocromo c oxidasa (cit ox) y GPAT NEM resistente (GPAT) en mitocondrias puras (puras) y en las fracciones submitocondriales obtenidas a partir de las mismas (OMMp, IMMp y CS). Los valores representan el promedio  $\pm$  desvío estándar de tres fraccionamientos independientes. **II** Se sembraron 50  $\mu$ g de proteína total de mitocondrias puras (P) y sus fracciones (OMMp, IMMp y CS) en geles 8% (panel A) o 12% (panel B). Las proteínas se transfirieron a membranas PVDF y se reveló con anticuerpos anti-GPAT1 o anti-VDAC respectivamente.

crudas se enriquece en la fracción de sitios de contacto y por esta razón se denominó a esta fracción ER-CS ("endoplasmic reticulum-contact sites").

Como ocurrió en el procedimiento de purificación de mitocondrias en gradiente de Percoll, la actividad GPAT1 y la expresión de la proteína fueron discordantes en las fracciones submitocondriales obtenidas a partir de mitocondrias crudas. Si bien el máximo nivel de expresión se encontró en ER-CS (Figura 5.5, II), la actividad enzimática fue máxima en OMM (Figura 5.5, I). En la fracción ER-CS la actividad MAO resultó ser un 60% del valor obtenido en OMM mientras que la actividad GPAT1 fue de solo un 9 %.

Por el contrario, la actividad GPAT1 en las fracciones obtenidas a partir de mitocondrias puras presentó el mismo perfil que la actividad MAO y el marcador VDAC, con un máximo de actividad y expresión en la fracción OMMp (Figura 5.6).

En cuanto a la localización submitocondrial de la actividad GPAT1, los resultados indican que esta enzima está presente en los sitios de contacto (CS) pero como puede deducirse de la medida de actividad MAO, no se haya enriquecida selectivamente en los mismos.

### **5.3.3 La GPAT1 sintetizada *in vitro* marcada con $^{35}\text{S}$ se incorpora rápidamente en las mitocondrias en un proceso que requiere ATP**

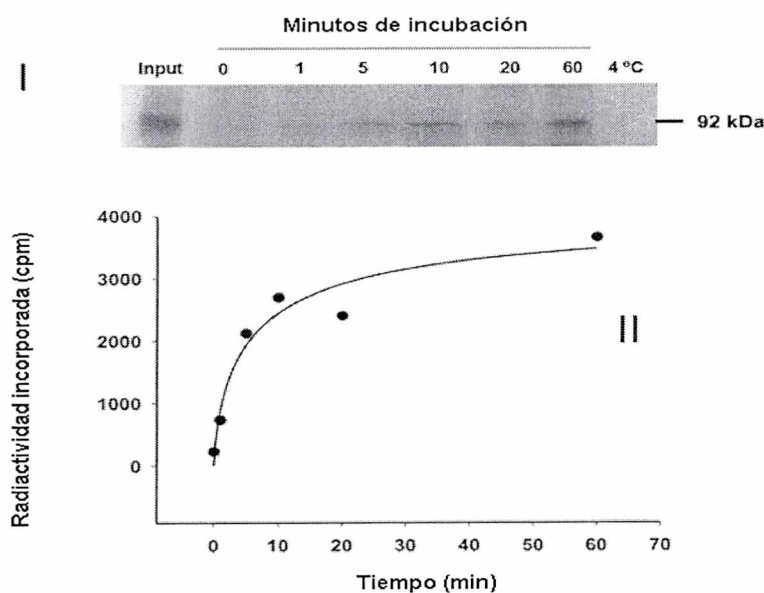
Se sintetizó *in vitro* GPAT1 marcada radiactivamente y se realizaron ensayos de importación utilizando como membranas aceptoras mitocondrias crudas, mitocondrias puras y microsomas. Los resultados obtenidos utilizando mitocondrias crudas fueron similares a los obtenidos con mitocondrias puras.

En la Figura 5.7 se puede observar que GPAT1 se incorpora rápidamente, alcanzando la saturación a los diez minutos de incubación.

Cuando la incubación se realiza a 4 °C durante 1 hora no se detecta radiactividad en las mitocondrias, por lo que el proceso de importación depende de la temperatura; también es dependiente de ATP ya que cuando el experimento se realizó en ausencia del mismo no hubo incorporación, aun a tiempos tan largos como 1 hora. (Figura 5.8, I).

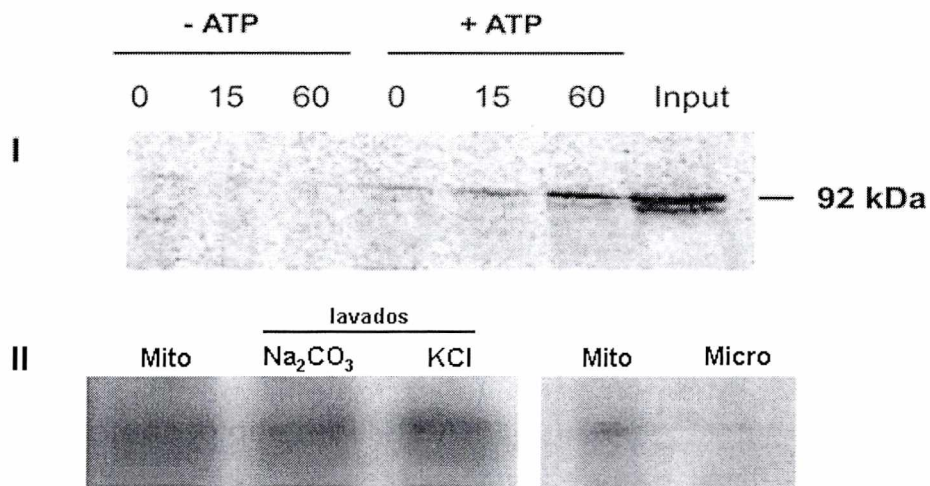
Además, la GPAT1 incorporada en las membranas mitocondriales se internaliza, ya que es resistente a la extracción con agentes caotrópicos o con soluciones alcalinas (Figura 8, II). Cuando se realizó el ensayo de importación en condiciones similares pero utilizando microsomas como membranas aceptoras no se detectó incorporación de la proteína radiactiva, lo cual corrobora la selectividad del proceso.

**FIGURA 5.7** Incorporación de GPAT1 sintetizada *in vitro* en mitocondrias puras de hígado de rata.



**Figura 5.7.** I Se incubó  $^{35}\text{S}$ -GPAT1 con mitocondrias puras durante períodos de tiempo variables a 30 °C. Se separaron luego las proteínas mitocondriales en SDS-PAGE 8% y se realizó el revelado mediante autoradiografía. II Determinación cuantitativa de la radiactividad incorporada en mitocondrias. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

### Figura 5.8 GPAT1 se internaliza en las membranas mitocondriales mediante un proceso que requiere ATP



**Figura 5.8.** I Se realizó la incorporación de  $^{35}\text{S}$ -GPAT1 en mitocondrias puras en ausencia (líneas 1 a 3) o presencia (líneas 4 a 6) de ATP y un sistema regenerador de ATP. Las incubaciones se realizaron durante 0 (líneas 1 y 4), 15 (líneas 2 y 5), y 60 (líneas 3 y 6) minutos. El "input" corresponde a la radiactividad de  $^{35}\text{S}$ -GPAT1 utilizada en cada ensayo de incorporación. II Se utilizaron 100  $\mu\text{g}$  de proteína total de mitocondrias puras (Mito) y microsomas (Micro) como membranas aceptoras para el ensayo de importación. Luego de 60 minutos de incubación a  $30^\circ\text{C}$  se extrajeron las proteínas periféricas mediante lavados con  $0,1\text{M Na}_2\text{CO}_3$  pH 11.5 o con  $0,5\text{M KCl}$ . Los resultados son representativos de dos experimentos independientes.

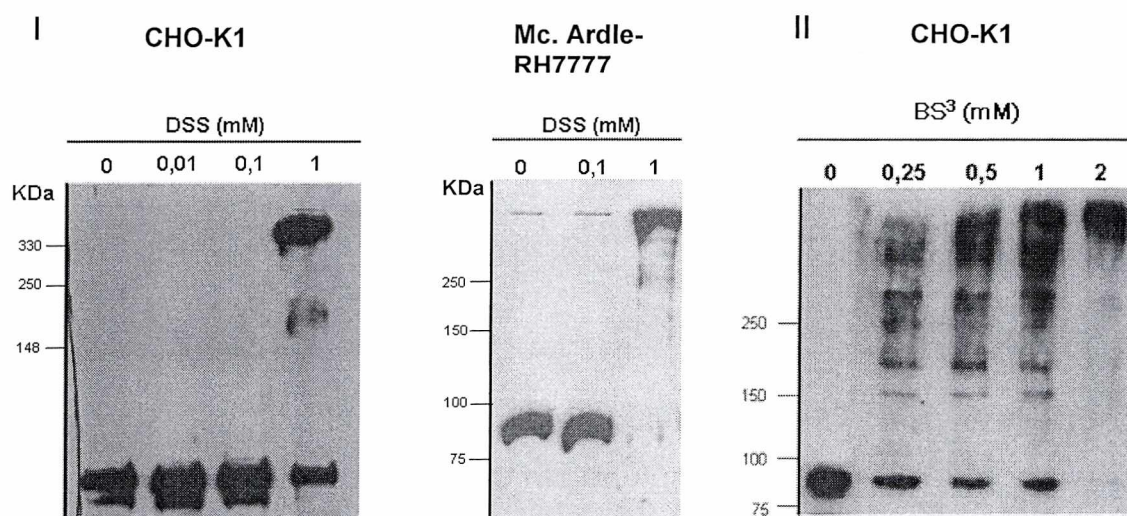
#### 5.3.4 GPAT1-FLAG sobreexpresada en células CHO-k1 o en células Mc. Ardle-RH7777 forma complejos de alto peso molecular

Con el objetivo de establecer posibles interacciones de GPAT1 con otras proteínas de la membrana mitocondrial externa, se realizaron experimentos de entrecruzamiento químico utilizando como material de partida membranas totales provenientes de células que sobreexpresaron GPAT1 marcada con un epítopo FLAG en el extremo C-terminal (GPAT-FLAG). En estos experimentos se pudo observar que cuando la concentración del reactivo entrecruzante disuccinimidil suberato (DSS)



alcanza una concentración de 1 mM en el tubo de reacción, aparecen bandas reactivas al anticuerpo monoclonal anti-FLAG de un tamaño aproximado de 180 y 360 kDa.

**Figura 5.9** GPAT1 sobreexpresada en células CHO-K1 o Mc. Ardle-RH7777 forma un complejo de alto peso molecular.



**Figura 5.9** Se incubaron 100  $\mu$ g de proteína total proveniente de células en cultivo que sobreexpresaron GPAT1-FLAG (CHO-K1 o Mc. Ardle-RH7777) con concentraciones crecientes de los reactivos entrecruzantes disuccinimidil suberato (DSS) (I) o bis(sulfosuccinimidil)suberato (BS<sup>3</sup>) (II). Luego de una hora de incubación en hielo se frenó la reacción, se separaron las proteínas en SDS-PAGE 6%, se transfirieron a membranas PVDF y se incubaron con anticuerpo anti-FLAG. El revelado se realizó por quimioluminiscencia.

Tanto las células CHO-K1 transfectadas con GPAT-FLAG como las células Mc. Ardle-RH7777 infectadas con un adenovirus que porta el gen de GPAT1 presentan estos complejos (Figura 5.9, I). Cuando el experimento de entrecruzamiento se realizó con el reactivo bis(sulfosuccinimidil)suberato (BS<sup>3</sup>), aparecieron cuatro bandas reactivas

al anticuerpo anti-FLAG, cuyos tamaños aproximados fueron 160, 180, 290 y 360 KDa (Figura 5.9, II).

Para detectar estos complejos en mitocondrias de hígado de rata, se realizaron experimentos de entrecruzamiento utilizando como muestra mitocondrias crudas y el anticuerpo policlonal anti-GPAT1; si bien se probaron numerosas condiciones experimentales no pudieron detectarse complejos de alto peso molecular reactivos al anticuerpo anti-GPAT1. Sin embargo, al aumentar la concentración de reactivo entrecruzante, disminuyó la intensidad de la banda correspondiente a GPAT1, sugiriendo que podía formarse algún complejo que no puede detectar el mencionado anticuerpo.

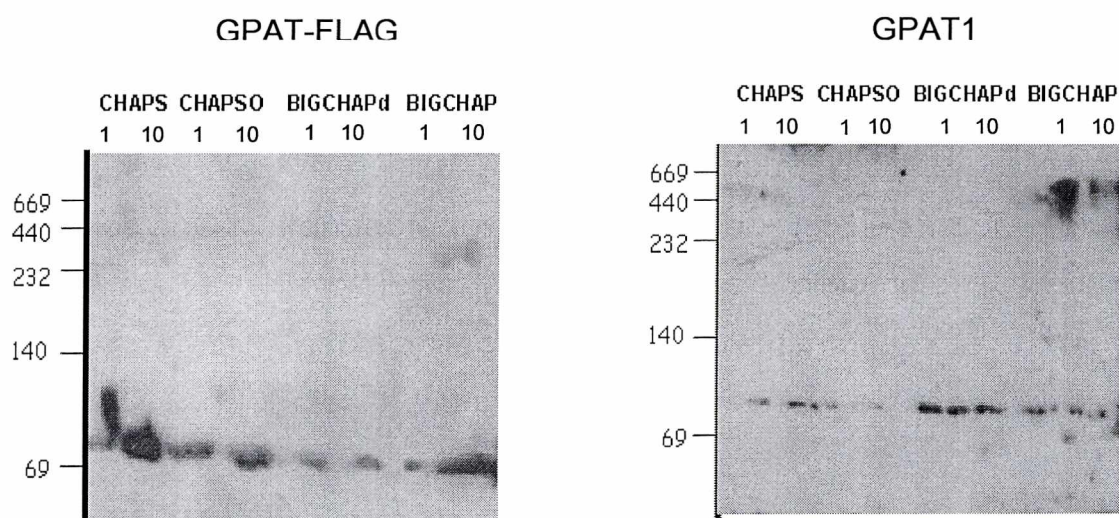
### **5.3.5 El detergente no iónico BIGCHAP solubiliza de las membranas mitocondriales un complejo de alto peso molecular reactivo a los anticuerpos anti-FLAG y anti-GPAT1.**

Para establecer la identidad de los complejos formados por entrecruzamiento químico, se puso a punto un sistema de solubilización de los mismos con distintos detergentes, con el objetivo de inmunoprecipitarlos. Los distintos detergentes se utilizaron a la concentración micelar crítica o a 10 veces dicha concentración (Garavito RM y col, 2001).

Los detergentes colato de sodio y Triton X-100 solubilizaron GPAT1 de las membranas mitocondriales, tanto a partir de mitocondrias crudas de hígado de rata como de particulados de células CHO-K1, pero no mantuvieron la estructura nativa del complejo. También se realizaron experimentos de solubilización utilizando los detergentes no iónicos derivados de las sales biliares CHAPS, CHAPSO, BIG CHAP y desoxi-BIG CHAP (ver materiales y métodos). Solo el detergente BIGCHAP permitió la solubilización de un complejo de alto peso molecular (Figura 5.10). Este

complejo se visualizó tanto en muestras de mitocondria de hígado de rata con un peso molecular de aproximadamente 440 KDa como en células CHO-K1 transfectadas (con un peso de 380 KDa). Con el objetivo de identificar las proteínas que forman este oligómero, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación. Lamentablemente, si bien se probaron numerosas condiciones experimentales, no se pudo lograr este objetivo.

### **Figura 5.10 Solubilización de GPAT1 con detergentes no iónicos**



**Figura 5.10** Se solubilizaron con detergentes no iónicos 100 µg proteína total provenientes de membranas totales de células CHO-K1 que sobre expresaron GPAT1-FLAG (GPAT-FLAG) o de mitocondrias crudas de hígado de rata (GPAT1). Los distintos detergentes se utilizaron a la concentración micelar crítica (**1**) o a 10 veces dicha concentración (**10**). Las proteínas solubles se separaron en un gel en gradiente nativo de poliácilamida 4-15%, se transfirieron a membranas PVDF y se incubaron con anticuerpos ant-FLAG o anti-GPAT1. El revelado se realizó por quimioluminiscencia.

## **5.4 DISCUSIÓN**

Las mitocondrias de hígado de rata obtenidas por el método clásico de centrifugación diferencial ("mitocondrias crudas"), se encuentran contaminadas principalmente con retículo endoplasmático. A estas membranas de origen reticular que co-sedimentan a 10.000 x g con la fracción mitocondrial se las denominó membranas asociadas a

mitocondrias (MAM "mitochondrial associated membranes") (Vance JE, 1990; Rusinol AE y col, 1994).

Con el objetivo de contar con mitocondrias altamente puras para obtener fracciones submitocondriales, se escogió un método de purificación que utiliza una centrifugación isopícnica en gradiente de Percoll (Hovius R y col, 1990; Vance JE, 1990). En este procedimiento, las membranas asociadas a mitocondria (MAM) se separan de la fracción mitocondrial como una banda de menor densidad (Figura 5.1).

La fracción MAM constituye una región especializada del retículo endoplasmático, enriquecida en enzimas de la biosíntesis de lípidos como fosfatidilserina sintasa y fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa (Vance JE, 1990), acilCoA:colesterol aciltransferasa y diacilglicerol aciltransferasa (Rusinol AE y col, 1994), y acilCoA sintetasa-4 (Lewin TM y col, 2002). Se ha implicado a estas membranas en distintos procesos como el transporte de fosfolípidos (Daum G y Vance JE, 1997), la secreción de VLDL (Rusinol AE y col, 1994) y la síntesis de aminofosfolípidos (Voelker DR, 2005). La hipótesis de que estas membranas constituyen una zona especializada del retículo endoplasmático fue corroborada por el descubrimiento de una enzima marcadora exclusiva de esta fracción, la fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa 2 (PEMT2) (Cui Z y col, 1993).

Cuando se analizó la actividad y expresión de GPAT1 en las diferentes fracciones, se pudo constatar una discrepancia entre estas variables. Si bien la actividad específica resultó máxima en las mitocondrias puras, la máxima expresión de la enzima se encontró en la fracción MAV. Esta fracción se enriqueció en actividad GPAT1 con respecto al material de partida (mitocondrias crudas), pero el porcentaje de recuperación de actividad GPAT1 en MAM+MAV fue de solo un 20%. Esto significa que el pool activo de GPAT1 presente en las mitocondrias

crudas se recuperó principalmente en las mitocondrias puras luego de la centrifugación en gradiente de Percoll. Por el contrario, en la fracción MAV particionó un pool de GPAT1 relativamente inactivo.

Si bien los resultados obtenidos en el procedimiento de purificación de mitocondrias en gradiente de Percoll fueron indicativos de la existencia de un pool de GPAT1 inactivo, esta suposición fue confirmada al realizar el fraccionamiento submitocondrial tomando como material de partida mitocondrias crudas. En este caso y en concordancia con resultados obtenidos por otros autores (Ardail D y col, 1993), se obtuvo una fracción de sitios de contacto enriquecida retículo endoplasmático (ER-CS). Precisamente esta fracción, presentó un pool de GPAT1 relativamente inactivo, como surge del análisis de la expresión de la enzima y de las actividades GPAT1 y MAO.

¿Qué relación existe entre MAV y ER-CS? Si bien MAV se obtiene a partir de la misma banda del tubo de Percoll que MAM, difiere de la misma porque no contiene la enzima marcadora de dicha fracción (PEMT2). Mediante microscopía electrónica se estableció que consta principalmente de grandes vesículas y que no contiene mitocondrias y el análisis bioquímico permitió demostrar que presenta marcadores tanto de membranas mitocondriales (externa e interna) como de retículo endoplasmático. En la bibliografía se han reportado distintos estudios utilizando esta fracción, pero en general no se la ha diferenciado de la fracción MAM (Vidugiriene J y col, 1999; Schwer B y col, 2004). Las características bioquímicas y el hecho de que particione en la banda superior del tubo de Percoll permiten suponer que esta fracción estaría enriquecida en los sitios de contacto que existen entre mitocondria y retículo endoplasmático (ER-CS), los cuales serían "arrastrados" hacia la banda de menor densidad cuando se realiza el fraccionamiento.

La discrepancia entre actividad y expresión de GPAT1 ha sido descrita por otros autores. Por ejemplo, la expresión de GPAT1 es alta en corazón y glándula adrenal, sin embargo la actividad NEM resistente es relativamente baja en estos tejidos (Lewin TM y col, 2001). Además, se ha demostrado que luego del ejercicio intenso la actividad GPAT NEM resistente y el ARN mensajero en la grasa epididimal se incrementan considerablemente, sin embargo el efecto es poco notable al estudiar la expresión de la enzima (Kump DS y col, 2006).

La existencia de un pool inactivo de GPAT1 en ER-CS permite explicar de algún modo estas discrepancias entre actividad y expresión. Este pool inactivo podría sufrir alguna modificación postraduccional inducida por alguna señal no identificada hasta el momento. En este sentido, se ha demostrado la activación de GPAT1 por caseína quinasa 2 *in vitro*, tanto en hígado de rata (Onorato TM y col, 2005) como en linfocitos T (Collison LW y Jolly CA, 2006) aunque el significado fisiológico de esta modificación no se comprende del todo ya que CK2 es una quinasa activa constitutivamente (Gonzalez-Baro y col, 2007).

Uno de los objetivos del trabajo descrito en el presente capítulo que fue establecer si GPAT1 se encuentra enriquecida en los sitios de contacto entre membranas mitocondriales interna y externa; al respecto, a partir de los resultados obtenidos al fraccionar mitocondrias puras en gradiente discontinuo de sacarosa, se puede concluir que la actividad específica GPAT1 es alta en los sitios de contacto pero no se halla selectivamente enriquecida en los mismos.

La existencia de un pool inactivo de GPAT1 en sitios de contacto asociados a retículo endoplasmático planteó la necesidad de estudiar el proceso de importación de GPAT1 hacia la mitocondria, ya que el mismo podría ocurrir desde el retículo endoplasmático hacia la mitocondria vía MAM como se ha descrito para otras proteínas (Schwer B y col, 2004). El

hecho de que las mitocondrias puras sean capaces de incorporar e internalizar la proteína marcada *in vitro* y que los microsomas no lo hagan, indica que la GPAT1 utiliza la vía clásica de importación para proteínas mitocondriales (Truscott KN y col, 2003; Rapaport D, 2005). Es probable que el proceso de incorporación involucre la interacción con chaperonas citosólicas ya que es dependiente de la hidrólisis de ATP. Además, GPAT1 no sufre ningún clivaje al ser internalizada, ya que el tamaño de la proteína es el mismo antes y después del proceso de importación.

Los experimentos de entrecruzamiento químico permitieron demostrar que en células CHO-K1, GPAT1 forma complejos de alto peso molecular; sin embargo, no pudo establecerse cual es la identidad de dichos complejos. Los tamaños obtenidos son compatibles con la formación de homo-oligómeros de GPAT1, ya que las bandas reactivas al anticuerpo monoclonal anti-FLAG son de aproximadamente dos, tres y cuatro veces el peso molecular de la enzima. En este sentido, se han descrito otras enzimas del metabolismo de lípidos que presentan estructura tetramérica como la diacilglicerolaciltransferasa (DGAT) (Cheng D y col, 2001), la acilCoA-colesterol aciltransferasa (ACAT) (Yu C y col, 1999) o dimérica como la hidroximetilglutarilCoA liasa peroxisomal (HMG-CoA liasa) (Tuinstra RL y col, 2002); incluso se ha demostrado que la enzima PlsB de *E. coli* (homóloga a la GPAT1 de mamíferos) existe en la membrana de la bacteria como monómero y como dímero y que estas estructuras presentan distintas propiedades cinéticas (Scheideler MA y Bell RM, 1991).

El hecho de que no se hayan podido detectar estos complejos en las mitocondrias de hígado de rata, permite plantear la hipótesis de que los complejos observados en las células CHO-K1 podrían corresponder a intermediarios del proceso de importación (Schulke N y col, 1999). Los

ensayos de importación *in vitro* realizados en el presente trabajo demostraron que el proceso de importación de GPAT1 es dependiente de la hidrólisis de ATP. Esto implica que muy probablemente GPAT1 interaccione con la chaperona Hsp70 para luego ser reconocida por el complejo TOM de la membrana mitocondrial externa (Mihara K, 2004; Neupert W y Herrmann JM, 2007). En un sistema de sobreexpresión no regulada como el empleado aquí, estos intermediarios del proceso de importación podrían acumularse y ser detectados al realizar los experimentos de entrecruzamiento.

Sin embargo, la existencia de un oligómero en mitocondrias de hígado de rata queda demostrada por la solubilización de un complejo de alto peso molecular cuando se utilizó el detergente BIGCHAP y por la disminución de la intensidad de la banda correspondiente a GPAT1 al aumentar la concentración de los reactivos entrecruzantes. Además, este mismo detergente solubiliza un complejo de alto peso molecular a partir de membranas totales de células CHO-K1 que sobreexpresan GPAT-FLAG. Es probable entonces, que al realizar el entrecruzamiento químico se pierdan los epitopes reconocidos por el anticuerpo policlonal anti-GPAT1 y de esta manera no puedan detectarse los complejos.

En resumen, GPAT1 forma una estructura oligomérica en la membrana mitocondrial externa; los resultados obtenidos son compatibles con la formación de un homo-tetrámero, sin embargo no puede excluirse la interacción con otras proteínas de la membrana mitocondrial externa.



# **CAPÍTULO 6**

**Los dominios citosólicos de  
GPAT1 interaccionan y  
esta interacción es  
esencial para la actividad  
enzimática**



## 6.1 INTRODUCCIÓN

El clonado del gen que codifica para la enzima GPAT1 ha permitido realizar numerosos avances en cuanto al rol fisiológico de esta isoenzima en los distintos tejidos de mamífero, mediante estudios clásicos de sobreexpresión heteróloga, sobreexpresión en cultivos primarios, análisis de la expresión diferencial en distintos tejidos, construcción de ratones *knockout*, etc (Gonzalez-Baro y col, 2007). Pero además, el clonado de este gen ha permitido dilucidar ciertos aspectos estructurales y moleculares desconocidos hasta entonces, como la localización del sitio activo (Dircks LK y col, 1999) y la topografía de la enzima en la membrana mitocondrial externa (Gonzalez-Baro MR y col, 2001).

El marco de lectura abierto codifica para una proteína de 828 aminoácidos. Entre los aminoácidos 220 a 360 de la enzima, se encuentran 4 bloques cuyos residuos forman motivos de alta homología identificados mediante alineamiento de secuencias entre aciltransferasas tales como: glicerol-3-fosfato aciltransferasas (GPATs), acilglicerol-3-fosfato aciltransferasas (AGPATs) y dihidroxiacetona-fosfato aciltransferasas (DHPATs) provenientes de bacterias, levaduras, y mamíferos (Tabla 6.1).

Estudios de mutagénesis dirigida han permitido establecer cuales aminoácidos de estos motivos son esenciales para la catálisis o para la unión de los sustratos (Lewin TM y col, 1999; Heath RJ y Rock CO, 1998, Heath RJ y Rock CO, 1999, Dircks LK y col, 1999). La histidina y el aspartato del motivo I, la glicina en el motivo III y la prolina en el motivo IV juegan un rol importante en la catálisis, mientras que la fenilalanina y arginina del motivo II y el glutamato y la serina del motivo III son importantes para la unión del glicerol-3-fosfato.

**Tabla 6.1 Bloques de homología entre distintas aciltransferasas**

	Motivo I	Motivo II	Motivo III	Motivo IV
<b>GPAT</b>				
<i>E. coli</i>	303 VPCHRS <sup>H</sup> MDSYLL	348 GAFFIRRTF	382 YFVEGGRSRTGRLL	417 ITLIPIYI
<i>S. cerevisiae</i>	77 CAPHANQFIDPA	131 GGIPVPRIQ	257 IFPEGGSHDRPSLLP	292 VAVVPCGL
<i>M. musculus</i>	227 LPVHRSHIDYLL	272 GGFFIRRL	312 IFLEGTRSRSGKTSC	347 ILVIPVGI
<b>DHAPAT</b>				
<i>H. sapiens</i>	159 LPSHRSYIDFLM	204 SGAFFMRR	240 FFLEGTRSRSAKTLT	275 TYLVPISI
<b>AGPAT</b>				
<i>E. coli</i>	70 IANHQ <sup>N</sup> NYDMVT	112 GNLLIDRNN	144 MFPEGTRSRGRLL	172 VPIIPVCV
<i>S. cerevisiae</i>	102 IANHQSTLDIFM	121 GTYFLDRSK	153 VFPEGTRSTSELTML	183 IPIVPVVV
<i>M. musculus</i>	98 VSNHQSSLDLLG	140 GIIFIDRKR	172 VFPEGTRNHNGSML	200 VPIPIVF
<i>H. sapiens</i>	101 VSNHQSSLDLLG	143 GVIFIDRKR	175 VFPEGTRNHNGSML	203 VPIPIVM

Bloques de homología identificados mediante alineamiento de secuencias entre glicerol-3-fosfato aciltransferasas (GPAT), dihidroxiacetonafosfato aciltransferasa (DHAPAT) y acilglicerolfosfato aciltransferasas (AGPAT). Los aminoácidos en negrita son los conservados.

El conocimiento de la orientación de las enzimas de membrana resulta esencial para dilucidar las interacciones con sustratos y productos, especialmente cuando éstos son hidrofóbicos. En este sentido, el clonado del gen que codifica para GPAT1 también ha permitido determinar la topografía de la enzima en la membrana mitocondrial externa (Gonzalez-Baro MR y col, 2001). En este trabajo, se demostró que GPAT1 posee dos regiones transmembrana (aa 472-493 y aa 576-592) con ambos extremos N- y C-terminal hacia la cara citosólica de la membrana y un loop (aa 494-575) hacia el espacio intermembrana (Figura 6.1).

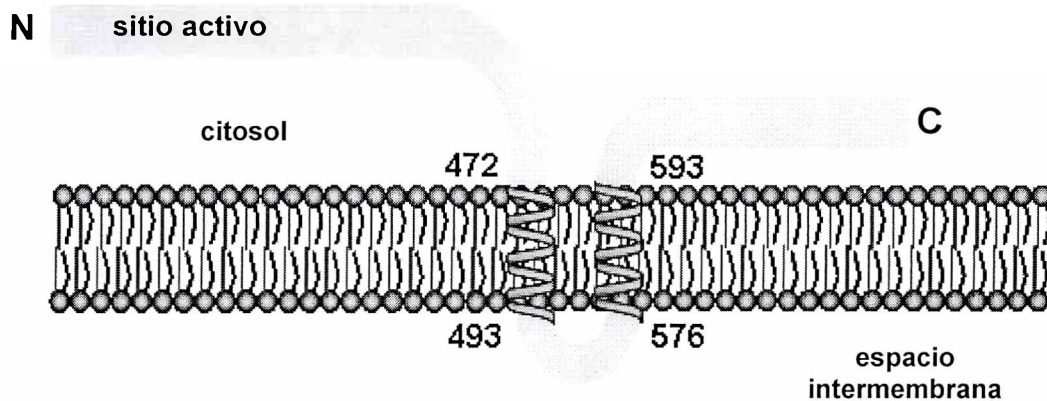
**Figura 6.1**

Figura 6.1. Topografía de la enzima glicerol-3-fosfato 1 en la membrana mitocondrial externa. N: extremo amino-terminal; C: extremo carboxilo-terminal.

Las enzimas AGPATs humanas y bacterianas, que catalizan el segundo paso en la vía de síntesis *de novo* de glicerolípidos, comparten con GPAT1 sustratos y productos similares estructuralmente pero son proteínas mucho más pequeñas (~285 aminoácidos). El alineamiento de secuencias entre AGPATs y GPAT1 muestra una región de sitio activo homóloga, pero las AGPATs carecen de la región C-terminal.

Teniendo en cuenta la topografía de GPAT1 en la membrana y la localización del sitio activo, se hipotetizó que la región C-terminal de la enzima no estaría involucrada en la catálisis, y por lo tanto podría funcionar como un dominio regulatorio. Como se mencionó anteriormente (1.4.2), la actividad GPAT1 resulta inhibida cuando se activa la AMPK (Muoio DM y col, 1999; Park H y col, 2002); si bien no se ha demostrado en forma directa la fosforilación de GPAT1 por AMPK, la región C-terminal de GPAT1 posee dos sitios consenso para la fosforilación por esta enzima (Figura 6.2). De igual manera, se ha reportado la activación de GPAT1 mediante fosforilación por CK2 y en

este caso también existen sitios consenso para la fosforilación catalizada por esta quinasa en la región C-terminal de GPAT1 (Onorato TM, 2005).

Por todo expuesto, es probable que modificaciones postraduccionales en la región C-terminal en respuesta a hormonas u otros factores afecten la actividad catalítica de GPAT1 en la región N-terminal de la proteína.

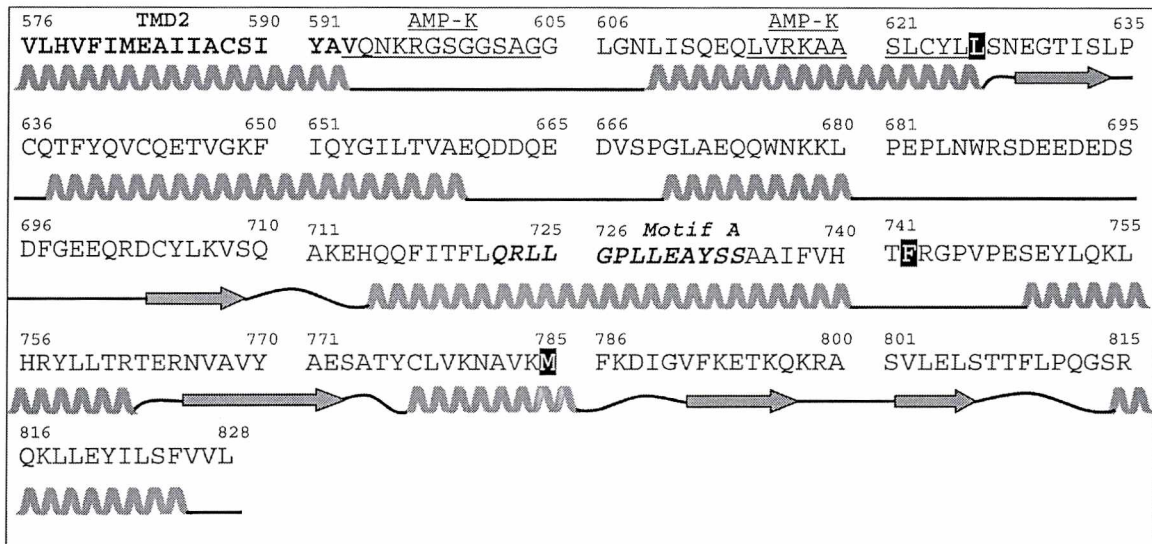
## 6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

El objetivo del presente capítulo fue comprobar la hipótesis de que la región C-terminal de GPAT1 no participa en la catálisis y por lo tanto funciona como un dominio regulatorio de la actividad de la enzima

## 6.3 RESULTADOS

### 6.3.1 Construcción de mutantes truncados en la región C-terminal.

Si bien el dominio N-terminal de GPAT1 contiene motivos altamente homólogos a otras aciltransferasas, la región C-terminal muestra en general, poca homología. Utilizando el *software* de alineamiento múltiple Clustal W ([www.ebi.ac.uk/clustalw](http://www.ebi.ac.uk/clustalw)) se identificó un nuevo motivo de homología desde los aminoácidos 722 al 734, denominado motivo A, el cual es 100% idéntico a GPAT1 de ratón, 38% idéntico a GPAT de *E. coli* y *Haemophilus sp.*, 30% idéntico a GPAT de *C. elegans* y *Drosophila sp.* y 30% idéntico a dihidroxiacetona fosfato aciltransferasa (DHAPAT) humana (Figura 6.2).

**Figura 6.2** Secuencia de aminoácidos de la región C-terminal de GPAT1

**Figura 6.2.** TMD2 (negrita), segundo dominio transmembrana (aa 576-593); AMP-K (subrayado), sitio consenso para la fosforilación por la proteína quinasa dependiente de AMP (aa 593-604 y 615-625); motif A (itálica y negrita), motivo A; los aminoácidos 626, 742 y 784 (resaltados) corresponden a los aminoácidos terminales de las construcciones truncadas. La estructura secundaria representada corresponde a la predicción promedio obtenida por 11 métodos diferentes. (cita)

El motivo A se encuentra en la cuarta hélice de las ocho  $\alpha$ -hélices predichas para el dominio C-terminal. La presencia de estas  $\alpha$ -hélices se determinó utilizando el predictor JPred (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/~www-jpred/>).

Para comprobar la hipótesis de que la región C-terminal de GPAT1 no estaría involucrada en la catálisis se obtuvieron distintas proteínas truncadas. Las construcciones truncadas después del aminoácido 626 contienen 2 de las 8  $\alpha$ -hélices putativas y los sitios consenso para la fosforilación por AMP-kinasa; las truncadas después del aminoácido 742 contienen 4  $\alpha$ -hélices putativas y el motivo A y las truncadas después del aminoácido 784 contienen 7 de las 8  $\alpha$ -hélices (Figura 6.2).

Para monitorear la expresión heteróloga en células eucariotas se agregaron epitopes FLAG en los extremos C-terminal y epitopes HA en la región N-terminal. La representación esquemática de las construcciones generadas con los respectivos epitopes se muestran en la Figura 6.3.

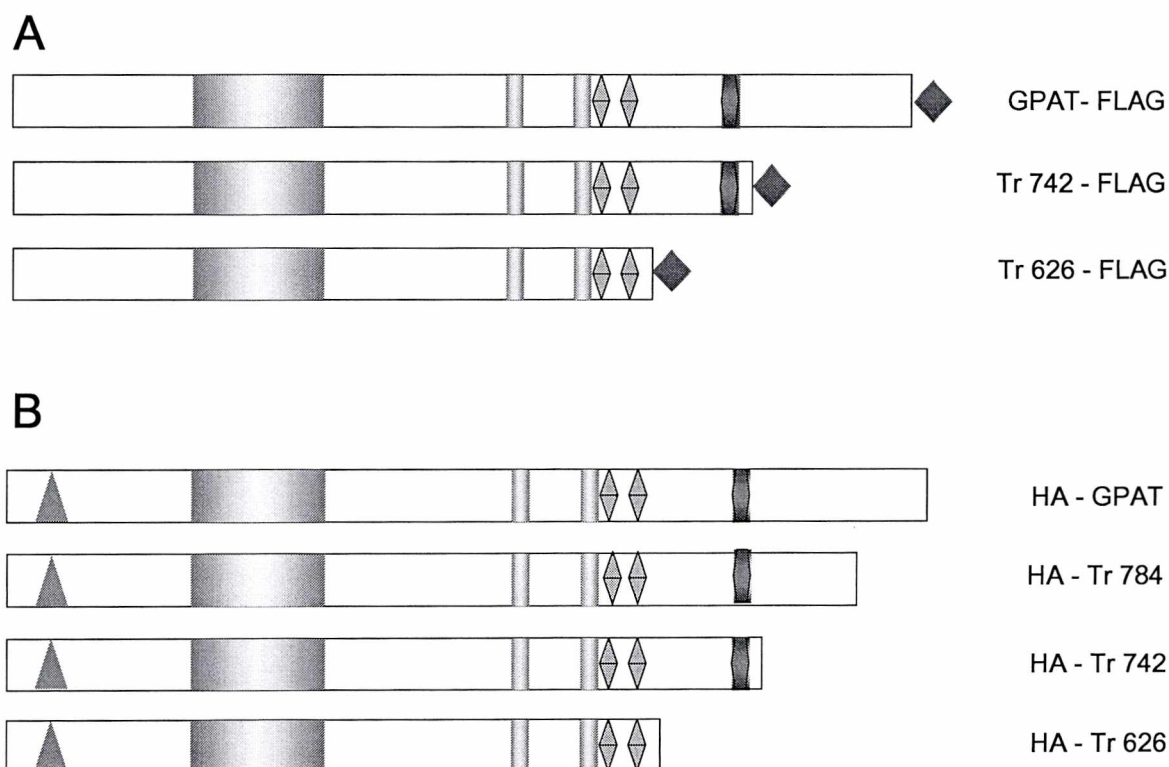
### **6.3.2 Optimización de las condiciones de transfección transitoria y de la medida de actividad enzimática.**

Las condiciones de transfección que resultaron óptimas en cuanto a la expresión de la proteína recombinante (medida por western blot) resultaron ser: 5  $\mu\text{g}$  de plásmido complejado con 18  $\mu\text{l}$  de liposomas catiónicos (Lipofectamina®) en placas de 60 mm de diámetro. El tiempo de transfección fijado fue de 27 horas a 37 °C.

Se optimizó la medida de la actividad enzimática utilizando membranas totales de células que sobreexpresaron GPAT-FLAG. La concentración de palmitoil-CoA escogida fue 60  $\mu\text{M}$  ya que a concentraciones mayores se produce un efecto inhibitorio (Figura 6.4). Estos resultados coinciden con los obtenidos a partir de mitocondrias purificadas de hígado de rata (Bates EJ y Saggerson ED, 1979).

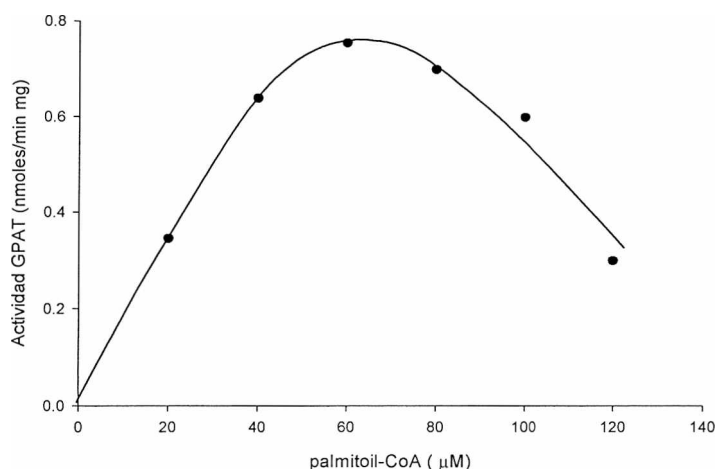
Se chequeó la linealidad del ensayo de actividad; la misma se mantiene empleando tiempos de reacción de 15 minutos (Figura 6.5). Para ensayos posteriores se fijó un tiempo de 10 minutos.



**Figura 6.3** Mutantes truncados en la región C-terminal

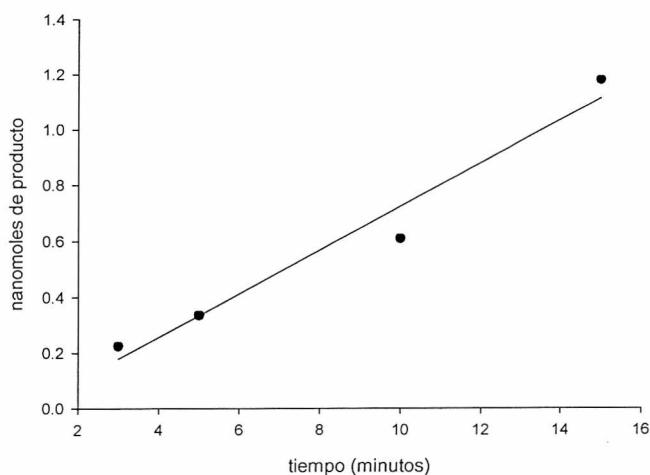
**Figura 6.3.** El esquema representa la región de sitio activo (bloque gris, aa 224 a 326), los dominos transmembrana (bloques amarillos), los sitios consenso putativos para AMP-kinasa (rombos) y el bloque de homología A (bloque azul). **A)** Se agregó el epítipo antigénico FLAG (rombo rojo) al extremo C-terminal de la GPAT de longitud completa (GPAT - FLAG) y a las GPATs truncadas después del aminoácido 626 ( Tr 626-FLAG) y 742 ( Tr 742-FLAG). **B)** Se introdujo el epítipo antigénico HA (triángulo verde) a la altura del aminoácido 33 de la GPAT de longitud completa (HA-GPAT), y de las GPATs truncadas después de los aminoácidos 626 ( HA-Tr 626), 742 ( HA-Tr 742) y 784 ( HA-Tr 784).

**Figura 6.4** Actividad GPAT NEM resistente en función de la concentración de palmitoil-CoA.



**Figura 6.4.** Se midió la actividad GPAT NEM resistente de membranas totales obtenidas a partir de células CHO-K1 que sobreexpresaron GPAT-FLAG, en función de la concentración de palmitoil-CoA (100  $\mu\text{g}$  de proteína total por tubo).

**Figura 6.5** Linealidad del ensayo de actividad GPAT.



**Figura 6.5** Se incubaron 100  $\mu\text{g}$  de membranas totales obtenidas a partir de células CHO-K1 que sobreexpresaron GPAT-FLAG con los sustratos de la reacción y se midió la aparición de producto en función del tiempo.

Si bien en cada experimento de transfección se emplearon las mismas cantidades de ADN plasmídico y células al mismo porcentaje de confluencia, la actividad específica GPAT NEM resistente de los particulados de células que sobre-expresaron GPAT-FLAG osciló entre 0,55 y 0,85 nmoles/min mg. Teniendo en cuenta que la actividad de los particulados de células trasfectadas con el vector vacío (control negativo) fue de 0,09 +/- 0,01 nmoles/min mg, la sobreexpresión de GPAT-FLAG produce un incremento en la actividad GPAT NEM resistente de aproximadamente 6 a 9 veces. Por otra parte, los particulados obtenidos a partir de células trasfectadas con la construcción HA-GPAT presentan incrementos de aproximadamente 3,5 a 5 veces.

Estos resultados indican que, aún manteniendo las condiciones de transfección constantes en cada experimento independiente, los niveles de expresión de la enzima en las células presentaron un porcentaje de variación de 20%.

Con el objetivo de poder normalizar los niveles de expresión, se puso a punto un sistema de co-transfección de las distintas construcciones de GPAT con un plásmido cuyo inserto corresponde al gen que codifica para la enzima fosfatasa alcalina secretada de placenta (sPAP). La actividad fosfatasa alcalina en los sobrenadantes de los cultivos es proporcional a la eficiencia del proceso de transfección en cada una de las placas y por lo tanto al nivel de expresión de los genes trasfectados.

Las condiciones de co-transfección seleccionadas fueron las siguientes: se transflectaron en cada placa de 60 mm 5 µg de pCMV-sPAP junto con 5 µg de construcción GPAT1 mutante durante 27 horas. Al cabo del tiempo indicado se tomaron 100 µl del sobrenadante del cultivo y se midió la actividad fosfatasa alcalina. Los valores de actividad obtenidos

fueron de  $0,18 \pm 0,04$  UE/l de cultivo ( $n=5$ ). La variación obtenida en los niveles de expresión de la enzima secretada coincide aproximadamente con la obtenida mediante la medición de la actividad GPAT de células que sobreexpresan GPAT-FLAG. (aproximadamente 20%)

#### **6.3.4 Las proteínas truncadas se expresan en las células CHO-K1 pero son enzimáticamente inactivas.**

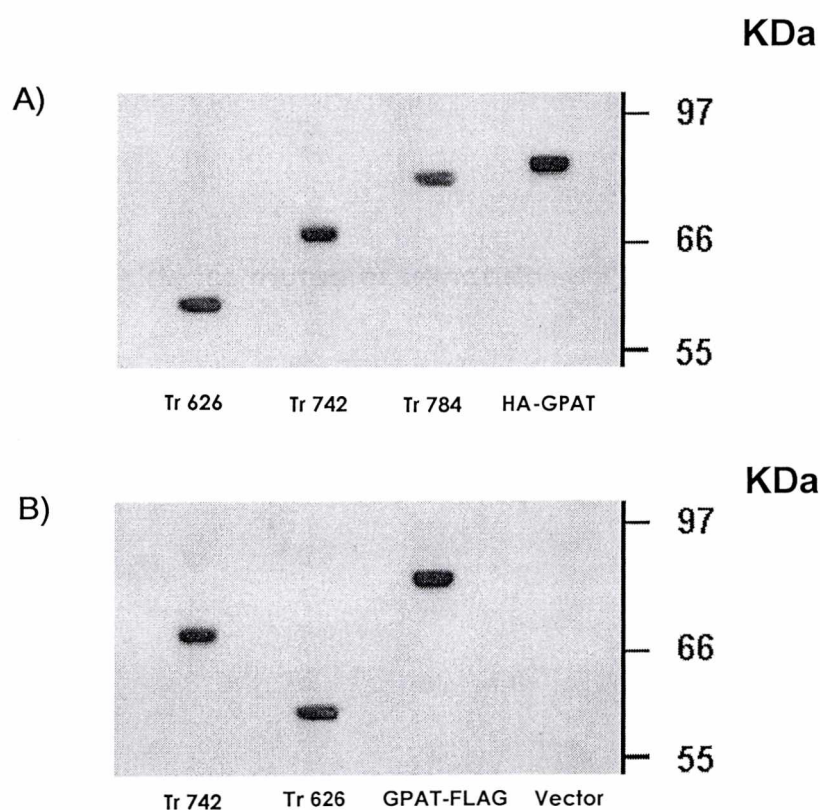
En cada experimento independiente se transfectaron las construcciones truncadas de un determinado grupo (construcciones con epitopes FLAG o construcciones con epitopes HA) junto con el vector de clonación sin inserto (pcDNA 3.1) como control negativo y las construcciones sin truncar (HA-GPAT o GPAT-FLAG) como control positivo.

Para monitorear la expresión heteróloga en células CHO-K1, se analizaron las membranas totales mediante western blot utilizando los anticuerpos apropiados. Según los resultados obtenidos (Figura 6.6), se pudo constatar que los tamaños de las proteínas fueron los esperados según la secuencia del ADN insertada en el vector de expresión (~92 kDa para HA-GPAT y GPAT-FLAG, ~ 89 kDa para HA-Tr784, ~85 kDa para HA-Tr 742 y Tr 742-FLAG y ~70 kDa para HA-Tr 626 y Tr 626-FLAG).

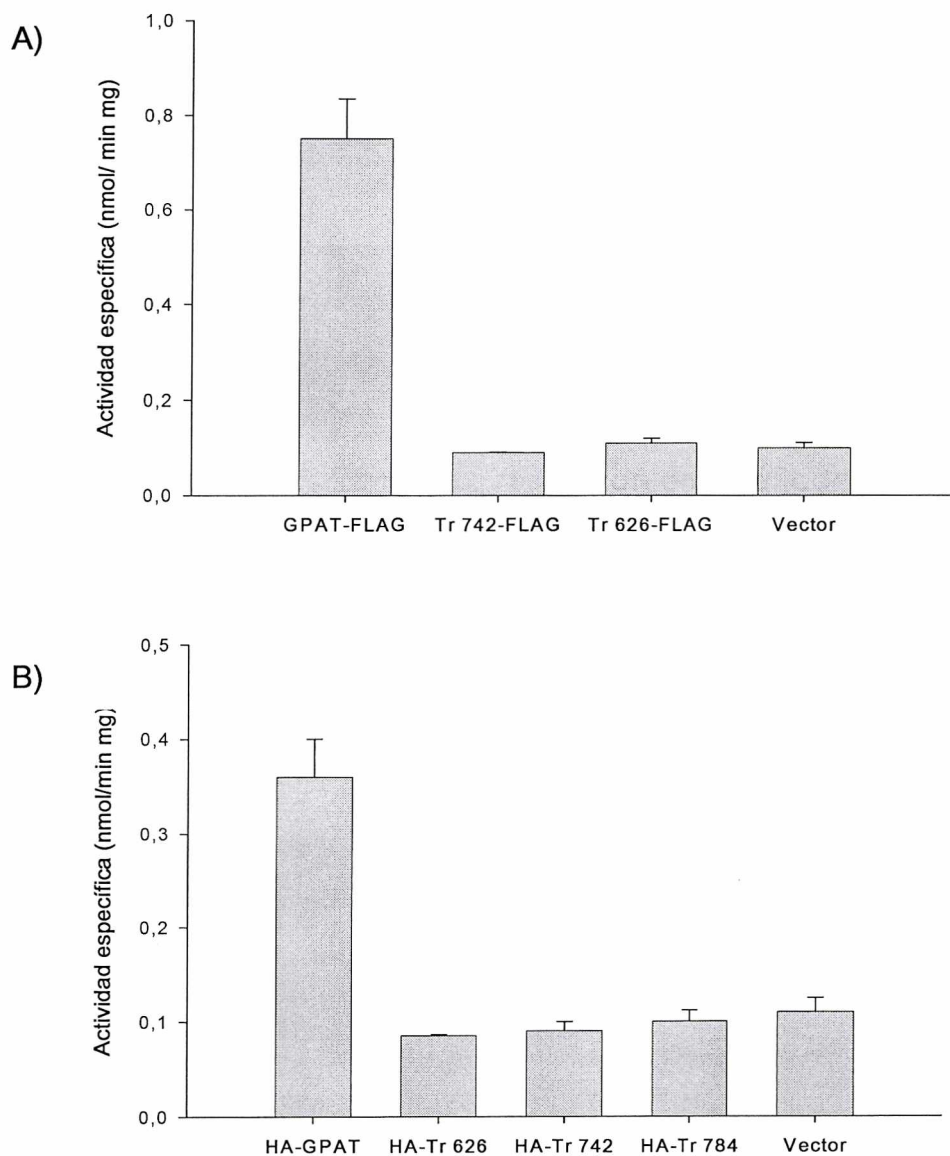
En todos los experimentos realizados (al menos 5 transfecciones independientes), los particulados que sobreexpresaron proteínas truncadas presentaron una actividad específica no distinguible a la obtenida con el control negativo (Figura 6.7). Por esta razón no fue necesario utilizar el sistema de co-transfección mencionado anteriormente para normalizar los niveles de expresión. Independientemente de las variaciones en los niveles de expresión de las proteínas truncadas, las actividades específicas siempre fueron indistinguibles de la de las obtenidas con el control negativo. Por lo tanto,

a partir de la medida de actividad específica y del análisis de la expresión se deduce que las proteínas truncadas se expresaron en células CHO-K1 pero fueron enzimáticamente inactivas.

**FIGURA 6.6** Expresión de los mutantes truncados de GPAT1.



**Figura 6.6.** 100  $\mu$ g de proteína total proveniente de membranas totales de células que sobreexpresaron **A)** HA-GPAT, HA-Tr 626, HA-Tr 742 y HA-Tr 784 o **B)** GPAT-FLAG, Tr 626-FLAG y Tr 742-FLAG se separaron en SDS-PAGE 8%, se transfirieron y se incubaron con los anticuerpos apropiados. Las membranas se revelaron por quimioluminiscencia. Los resultados son representativos de al menos 5 experimentos de transfección independientes.

**FIGURA 6.7** Los mutantes truncados resultaron enzimáticamente inactivos.

**Figura 6.7.** Los mutantes truncados resultaron enzimáticamente inactivos. Se midió la actividad GPAT NEM resistente de membranas totales provenientes de células que sobreexpresaron **A)** GPAT-FLAG, Tr 626-FLAG y Tr 742-FLAG y **B)** HA-GPAT, HA-Tr 626, HA-Tr 742 y HA-Tr 784. Los resultados son representativos de al menos cinco experimentos de transfección independientes.

### **6.3.5 La inactivación de los mutantes truncados no se debe a un cambio en los parámetros cinéticos de la enzima**

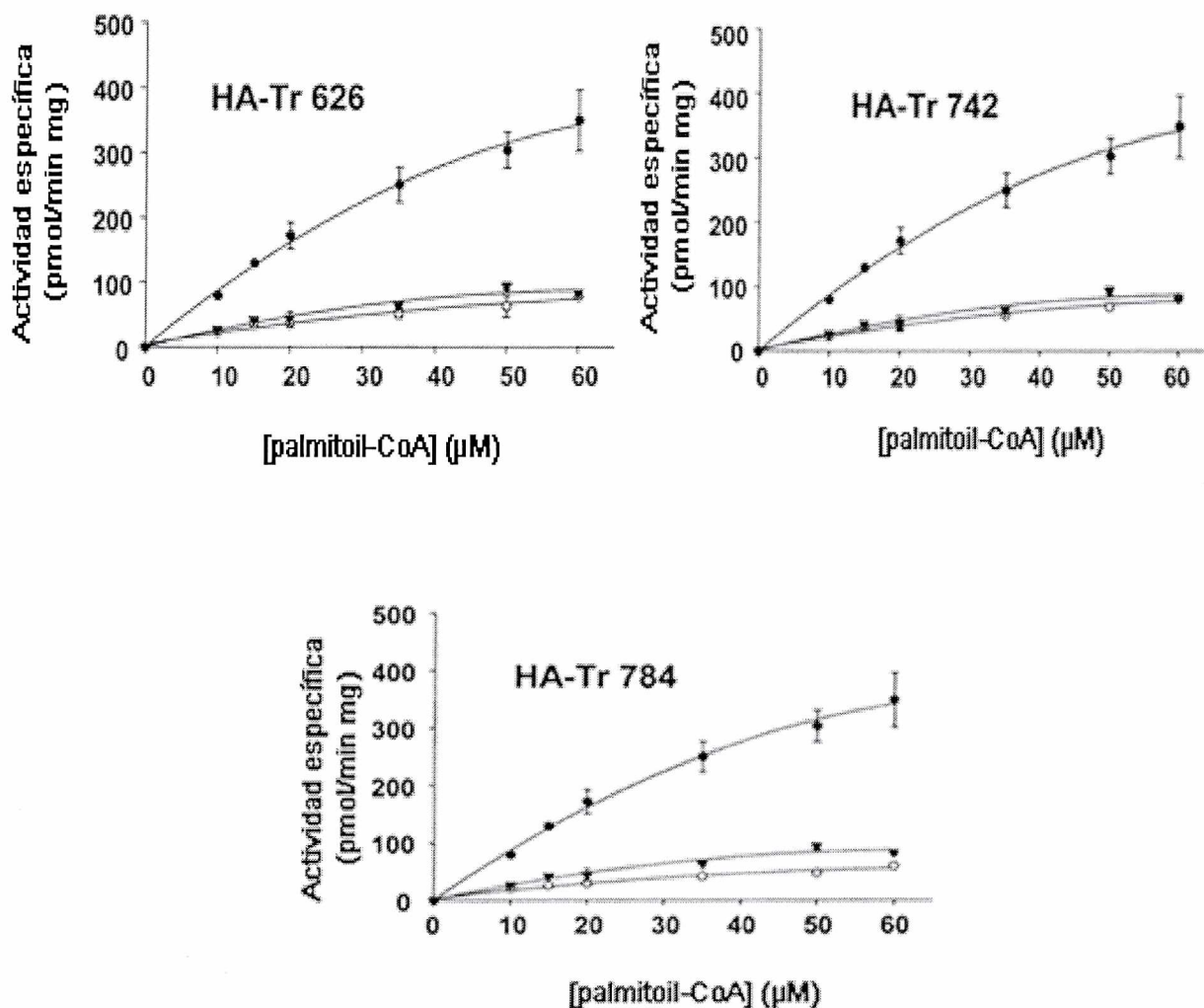
En base a la hipótesis de que la disminución de la actividad enzimática debida a la pérdida de una o más hélices de la región C-terminal podría ser consecuencia de una alteración en algunos de los parámetros cinéticos de la enzima, se midió la actividad GPAT NEM resistente de células que sobreexpresaron los mutantes truncados marcados con epitopes HA en la región C-terminal y de los respectivos controles (control positivo: HA-GPAT y control negativo pcDNA3.1) en función de la concentración de sustratos. La concentración máxima de palmitoil-CoA ensayada fue 60  $\mu\text{M}$  ya que a mayores concentraciones se produce un efecto inhibitorio (Figura 6.4).

Las membranas totales de células que sobreexpresaron los mutantes truncados presentaron una actividad específica no distinguible de la obtenida para el control negativo a todas las concentraciones ensayadas palmitoil-CoA (Figura 6.8). Se obtuvieron resultados similares al variar las concentraciones de glicerol-3-fosfato entre 0,2 y 4 mM.

### **6.3.6 Los mutantes truncados colocalizan con las mitocondrias**

Con el objetivo de corroborar que la inactivación enzimática no fue el resultado de una localización anómala de las proteínas mutantes, se efectuaron experimentos de colocalización utilizando un marcador mitocondrial fluorescente. Este marcador (Mito Tracker CMX-ROS, Invitrogen, Molecular probes) se incorpora selectivamente en mitocondrias de células vivas, ya que su internalización depende del gradiente de protones existente entre la matriz y el espacio intermembrana. Una vez incorporado, es resistente a los procesos usuales de fijación utilizados en las técnicas de inmunohistoquímica (fijación con

**Figura 6.8** Actividad GPAT de los mutantes truncados en función de la concentración de palmitoil-CoA.



**Figura 6.8** Se expresaron los mutantes truncados marcados con un epitope HA en la región N-terminal en células CHO-K1 y se determinó la actividad GPAT NEM resistente. En cada caso, la actividad de la enzima truncada (triángulos sólidos) se comparó con la actividad que presentó el control positivo (círculos sólidos) y el control negativo (círculos vacíos).

paraformaldehído, solventes orgánicos, permeabilización con detergentes, etc). La especificidad de la señal fluorescente se testeó incubando células CHO-K1 transfectadas con el vector sin inserto (control

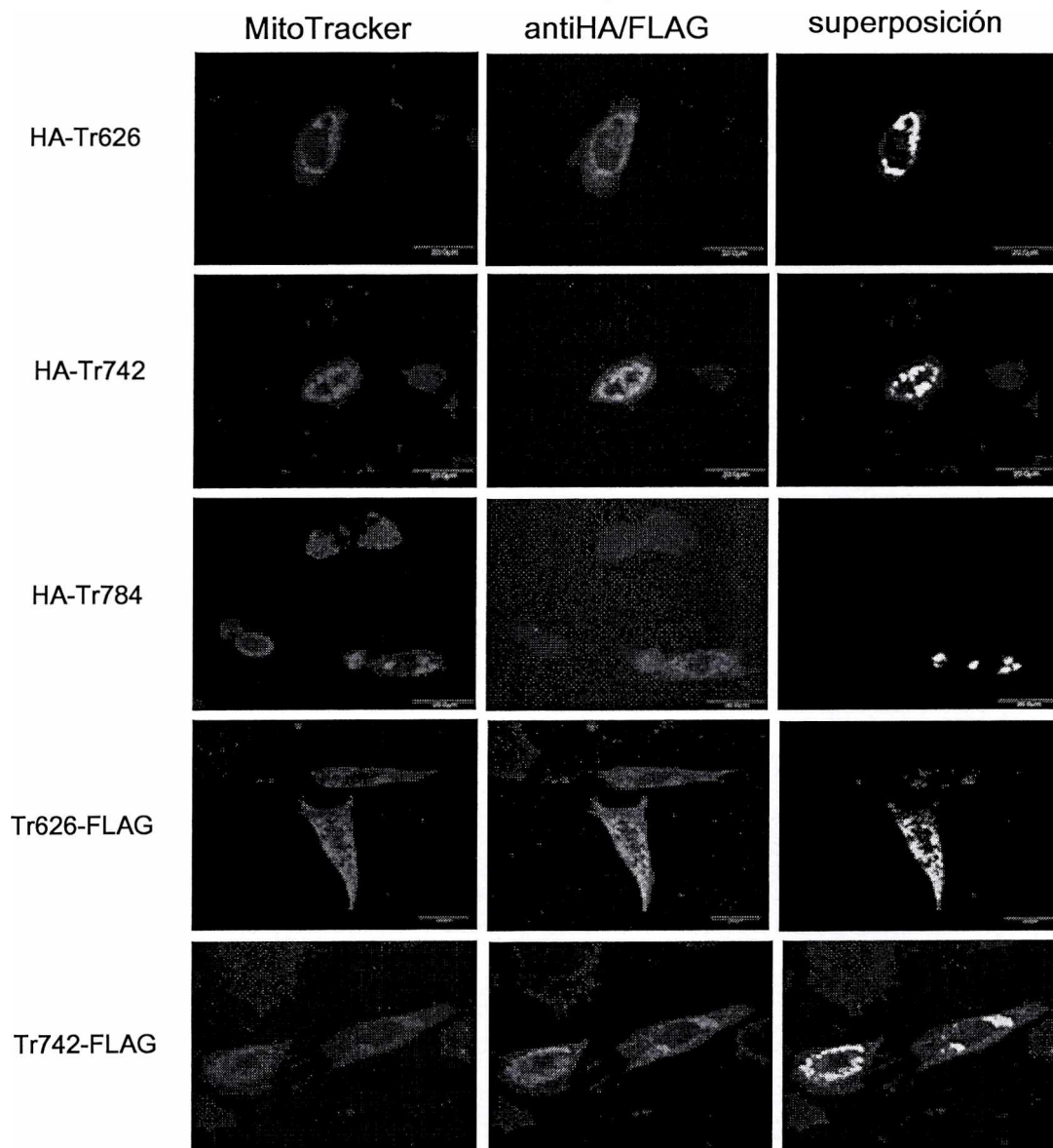


de transfección negativo) con los correspondientes anticuerpos primarios (anti-FLAG y anti-HA) y el anticuerpo secundario unido al fluoróforo AlexaFluor488. Además se incubaron células CHO-K1 que sobreexpresaron HA-GPAT y GPAT-FLAG sólo con el anticuerpo secundario. En ambos casos no se detectó señal fluorescente.

Tanto las células que sobreexpresaron las proteínas de longitud completa (HA-GPAT y GPAT-FLAG) como las que expresaron los mutantes truncados, presentaron una distribución perinuclear de la señal verde (correspondiente a la fluorescencia emitida por el anticuerpo secundario). Estas estructuras perinucleares, fueron positivas a la marcación por la sonda MitoTracker CMX-ROS, confirmando la localización mitocondrial de la proteínas sobreexpresadas y la preservación del potencial de membrana de las mitocondrias (Figuras 6.9 y 6.10).

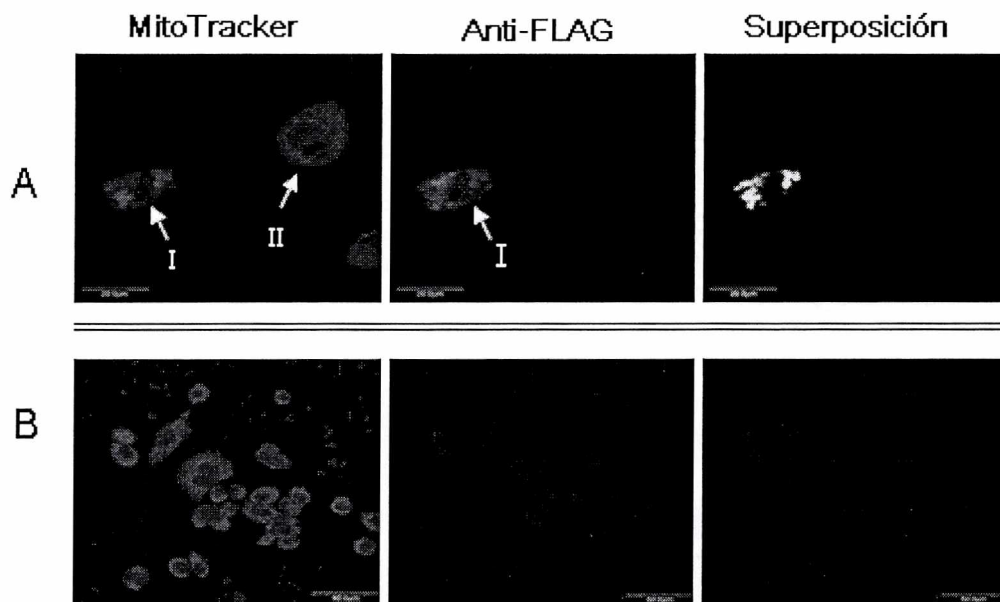
Teniendo en cuenta que las células CHO-K1 transfectadas con el vector vacío presentaron una distribución normal de las mitocondrias (Figura 6.10, B) y no se encontraron "agregados" en ninguno de los campos observados, se puede concluir que estas agrupaciones se generaron por la sobreexpresión de las proteínas recombinantes. La coexistencia en el mismo campo de células que sobreexpresaron proteína y presentaron un patrón mitocondrial alterado (Figura 6.10 A, I) junto con células no transfectadas que presentaron un patrón tubular normal (Figura 6,10 A, II) confirman esta suposición.

El análisis de las imágenes con el software ImageJ (NCBI), permitió establecer que las proteínas truncadas se localizan en las mitocondrias (Figura 6.6, paneles C).

**Figura 6.9** Los mutantes truncados colocalizan con las mitocondrias.

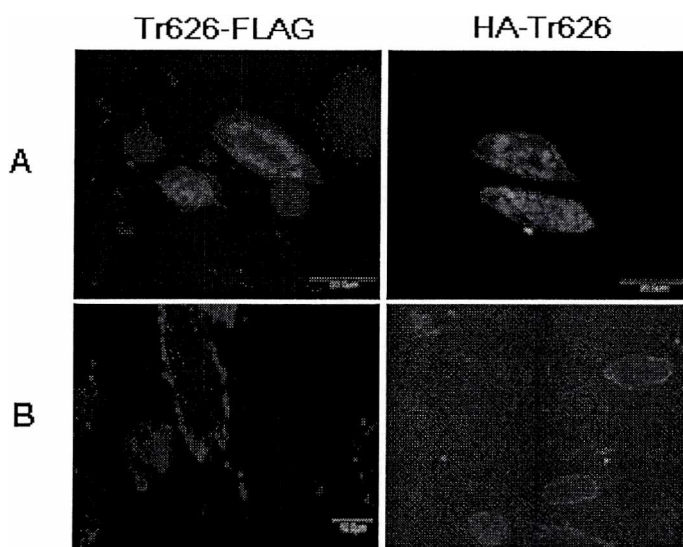
**Figura 6.9.** Las células CHO-K1 transfectadas con las construcciones truncadas se marcaron con una sonda vital mitocondrial (MitoTracker, CMS-ROS). Se fijaron luego con metanol y se incubaron con los anticuerpos primarios anti-FLAG o anti-HA y con el anticuerpo secundario anti IgG de ratón unido al fluoróforo Alexa Fluor 488. Los pixeles donde hay colocalización se obtuvieron mediante el programa Image J (superposición).

**Figura 6.10** Las células transfectadas presentan una distribución mitocondrial anómala.



**Figura 6.10.** Las células CHO-K1 transfectadas con la construcción GPAT-FLAG (A) o con el vector pcDNA 3.1 sin inserto (B) se marcaron con una sonda vital mitocondrial (MitoTracker). Se fijaron luego con metanol y se incubaron con el anticuerpo primario anti-FLAG y con el anticuerpo secundario anti IgG de ratón unido al fluoróforo Alexa Fluor488. Los pixeles donde hay colocalización se obtuvieron mediante el programa Image J (superposición). I: Célula transfectada con agrupamiento perinuclear de las mitocondrias. II: célula no transfectada con distribución mitocondrial normal.

Para establecer si las proteínas truncadas presentaron la orientación adecuada en la membrana mitocondrial externa, se realizaron experimentos de permeabilización de la membrana plasmática con el detergente digitonina a una baja concentración (10  $\mu\text{g/ml}$ ). En estas condiciones, el detergente permeabiliza de modo selectivo la membrana plásmática sin alterar la estructura de las organelas intracelulares (Gonzalez-Baro MR y col, 2001). Por lo tanto, la aparición de fluorescencia luego de la solubilización de la membrana plásmática con digitonina, implica que el epítipo reconocido por el anticuerpo primario se encuentra hacia el citosol.

**Figura 6.11**

**Figura 6.11** Se transfirieron células CHO-K1 con las construcciones Tr626-FLAG y HA-Tr626. Se fijaron con paraformaldehído 2,5% y se solubilizaron las membranas plasmáticas con el detergente digitonina (A). Se incubaron con el anticuerpo primario anti-FLAG o anti-HA y con el anticuerpo secundario anti IgG de ratón unido al fluoróforo Alexa Fluor 488. En B, se muestran los resultados obtenidos sin permeabilizar las membranas.

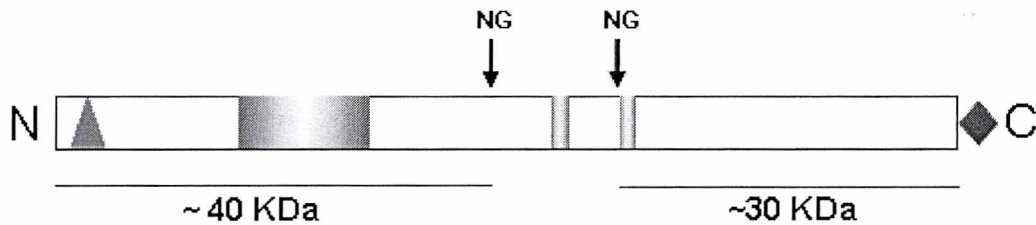
Tanto los mutantes truncados marcados con epítopes HA como los marcados con FLAG (Figura 6.3) presentaron fluorescencia verde al permeabilizar la célula con digitonina. En la figura 6.11 se muestran como ejemplo los resultados obtenidos con los mutantes Tr626-FLAG y HA-Tr626.

### 6.3.7 Los dominios citosólicos de GPAT1 interactúan.

La hidroxilamina es un reactivo que permite clivar uniones peptídicas entre residuos de asparagina-glicina. La construcción enzimáticamente activa HA-GPAT-FLAG (95 kDa) (Figura 6.12), presenta dos sitios susceptibles de hidroxilaminólisis, uno entre los aminoácidos 374-375 y el otro entre los aminoácidos 583-584. Como era de esperar, cuando esta proteína sobreexpresada en células CHO-K1 se trató con hidroxilamina se obtuvieron dos fragmentos proteolíticos, uno de aproximadamente 40 kDa positivo al anticuerpo anti-HA (Figura 6.13 B,

calle1) y otro de aproximadamente 30 kDa positivo al anticuerpo antiFLAG (Figura 6.13 C, calle1).

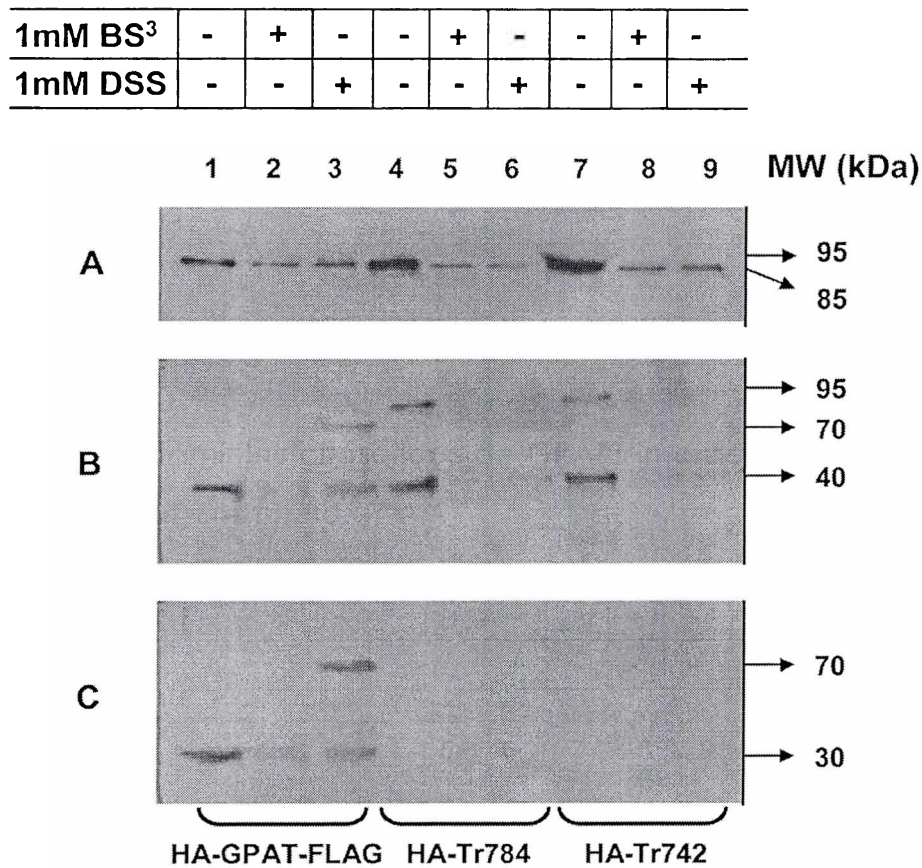
### Figura 6.12 Construcción HA-GPAT-FLAG.



**Figura 6.12.** Construcción enzimáticamente activa HA-GPAT-FLAG. El esquema representa la región de sitio activo (bloque gris, aa 224 a 326), los dominios transmembrana (bloques amarillos) y los epitopes HA (triángulo verde) y FLAG (rombo rojo). Con las flechas se indican los sitios susceptibles a hidroxilaminólisis (NG); también se indican los tamaños aproximados de los fragmentos proteolíticos generados.

Para demostrar una posible interacción entre los dominios citosólicos de la enzima, se realizó un entrecruzamiento químico de la proteína seguido de clivaje con hidroxilamina. Cuando se trataron las membranas totales de células CHO-K1 que sobreexpresaron HA-GPAT-FLAG con BS<sup>3</sup> 1 mM o DSS 1 mM, la intensidad de la banda de 95 kDa disminuyó debido a la formación de complejos de alto peso molecular no resueltos en el sistema empleado (SDS-PAGE 12%) (Figura 6.13 A, calles 2 y 3). Luego del entrecruzamiento químico, se trataron las muestras con hidroxilamina y solo la muestra tratada con DSS presentó una nueva banda reactiva al anticuerpo anti-HA de 70 kDa. (Figura 6.13 B, calle 2). Esta banda, también fue reactiva al anticuerpo anti-FLAG (Figura 6.13 C, calle 2) luego de la remoción de los anticuerpos ("stripping") de la membrana; estos resultados indican que la banda de 70 kDa reactiva a ambos anticuerpos (anti-HA y anti-FLAG)

**FIGURA 6.13** Los dominios citosólicos de GPAT1 interaccionan en la forma activa de longitud completa.



**Figura 6.13** Las construcciones HA-GPAT-FLAG (calles 1-3), HA-Tr784 (calles 4-6) y HA-Tr742 (calles 7-9) se sobreexpresaron en células CHO-K1, se obtuvieron las membranas totales y se separaron las proteínas en geles SDS-PAGE 12%. A) Las proteínas provenientes de membranas totales no tratados (calles 1, 4 y 7) o tratados con los reactivos entrecruzantes BS<sup>3</sup> (calles 2, 5 y 8) y DSS (calles 3, 6 y 9) a una concentración 1 mM, se separaron y se transfirieron a una membrana PVDF que se incubó con anticuerpo anti-HA B) Las mismas muestras descritas en A, se sometieron a clivaje químico con hidroxilamina luego del entrecruzamiento y los productos de esta la reacción se pusieron de manifiesto mediante la incubación con anticuerpo anti-HA. C) la misma membrana del punto B se trató de modo de remover los anticuerpos primario y secundario y se reincubó con anticuerpo primario anti-FLAG y el correspondiente anticuerpo secundario. En todos los casos el revelado se realizó por quimioluminiscencia.

detectada luego del entrecruzamiento con DSS y la posterior hidroxilaminólisis surge de la interacción de los dominios citosólicos de la

enzima. Como control negativo se realizaron los mismos experimentos con los mutantes truncados HA-Tr742 y HA-Tr784. El clivaje con hidroxilamina dio fragmentos de los tamaños esperados (Figura 6.13 B calles 4 y 7), pero no aparecieron nuevas bandas reactivas al anticuerpo anti-HA cuando se realizó previamente el entrecruzamiento con DSS o BS<sup>3</sup> (Figura 6.13 B calles 5, 6, 8 y 9).

## 6.4 DISCUSIÓN

Una metodología ampliamente utilizada para identificar dominios regulatorios presentes tanto en enzimas solubles o de membrana, como en receptores de membrana, ha sido la obtención de proteínas truncadas (Vickaryous NK y col, 2003; Bastida A y col, 2001; Lee FJ y col, 1996; Parker EM y Ross EM, 1990; Dasgupta M y Blumwntal DK, 1995). La conservación de la actividad catalítica o de unión al ligando de estos mutantes implica que los dominios removidos no participan en la catálisis y no afectan el plegamiento y por lo tanto el funcionamiento del dominio catalítico.

En este trabajo, se obtuvieron GPATs truncadas en la región C-terminal; si bien se esperaba que estos mutantes resultaran al menos parcialmente activos, todas las construcciones resultaron enzimáticamente inactivas, incluso el mutante HA-Tr784 que sólo carece de los últimos 44 aminoácidos. Esta pérdida de actividad podría deberse a una localización anómala de las proteínas mutantes, por lo que se estudió la localización subcelular mediante microscopía confocal. Así se determinó que la incorporación a mitocondrias de las enzimas truncadas es similar a la de las enzimas de longitud completa, y por lo tanto no se requiere de la región C-terminal para señalar la localización mitocondrial.

Inesperadamente, la sobreexpresión tanto de las proteínas control de longitud completa como de los mutantes truncados condujo a una alteración de la morfología de las mitocondrias, produciendo un agrupamiento perinuclear de las mismas. La morfología tubular normal de las mitocondrias resulta del balance de eventos de fusión y fisión. Las proteínas de tipo Fzo ("fuzzy onion" de *Drosophila melanogaster*) participan en los procesos de fusión en diversos organismos (Westermann B, 2003). Los mamíferos tienen dos proteínas homólogas a Fzo, conocidas como mitofusinas 1 y 2 (Mfn 1 y Mfn2). La sobreexpresión de Mfn2 en cultivos de células humanas provoca un agrupamiento perinuclear de las mitocondrias (Rojo M y col, 2002), similar al descrito en este trabajo; se especuló que la sobreexpresión de Mfn2 causaría una excesiva fisión mitocondrial que sería la responsable de este fenotipo. Sin embargo, también se ha descrito un fenotipo similar al sobreexpresar OMP25, una proteína relacionada con el metabolismo de fosfoinosítidos (Nemoto Y y De Camilli P, 1999). Estos resultados, junto con los reportados en el presente trabajo, parecen demostrar que el agregado perinuclear de las mitocondrias se genera inespecíficamente cuando se sobreexpresa en forma no regulada una proteína de la membrana mitocondrial externa.

El ensamblado de proteínas mitocondriales y la morfología de las mismas parecen estar relacionadas. La pérdida de una subunidad del complejo de ensamblado "*sorting and assembly machinery*" SAM (Pfanner N y col, 2004) provoca un cambio en la morfología de las mitocondrias debido a un defecto en el ensamblado del complejo "*traslocase outer membrane*" TOM (la traslocasa de proteínas de la membrana mitocondrial externa). Este defecto en el complejo TOM afecta la maquinaria de importación de muchas proteínas mitocondriales, incluyendo las necesarias para mantener la morfología normal de las mitocondrias. Por lo tanto, se puede proponer que la



sobreexpresión de GPAT1 en células CHO-K1 provoca la saturación de la maquinaria de importación de proteínas mitocondriales, con la consecuente alteración de su morfología.

Más allá del fenotipo aberrante de la distribución mitocondrial, no se vio afectada la actividad GPAT: la transfección de proteínas recombinantes de longitud completa (GPAT-FLAG y HA-GPAT) produjo un agrupamiento perinuclear de las mitocondrias pero aun así, las proteínas resultaron enzimáticamente activas.

Los mutantes truncados de GPAT1 carentes del dominio citosólico C-terminal fueron enzimáticamente inactivos, pese a que aparentemente no se afectó la localización y topografía de los mismos en la membrana mitocondrial externa. Además, mediante experimentos de entrecruzamiento y clivaje químico se demostró que los dominios citosólicos de GPAT1 interactúan entre sí. Esta interacción probablemente sea de tipo hidrofóbica ya que la misma se puso de manifiesto solo al tratar las muestras con el reactivo entrecruzante DSS y no con su análogo hidrosoluble.

Los resultados indican que se requiere de la integridad de la región C-terminal de GPAT1 para que la enzima sea activa. La interfase generada por la interacción de los dominios citosólicos de GPAT1 podría estar involucrada en la generación del sitio activo de la enzima o en la formación del sitio de unión para alguno de los sustratos (Rossmann MG y Liljas A, 1974). También esta interacción podría ser necesaria para la estabilidad conformacional de la proteína. En cualquiera de los casos, no puede excluirse la posibilidad de que la región C-terminal actúe como un dominio regulatorio, ya que cualquier modificación postraducciona en esta región podría afectar la interacción con la región N-terminal y por lo tanto la actividad enzimática.

# **CAPÍTULO 7**

## **Conclusiones**



Aunque la actividad GPAT ha sido extensamente caracterizada únicamente en mamíferos, la existencia de isoformas de GPAT mitocondriales parece ser un hecho conservado en la evolución. Existen secuencias homólogas al gen que codifica para GPAT1 en organismos tan diversos como *E. coli*, *H. influenzae*, *C. elegans* y *D. melanogaster*. Si bien numerosos trabajos sugieren que GPAT1 inicia la síntesis de TG en el hígado de los mamíferos, queda por aclarar cual es el destino final de este *pool* de TG o de los metabolitos intermediarios. Los experimentos realizados en hepatopáncreas de *M. borelli* permiten concluir que, aunque existe una vía alternativa a la síntesis *de novo* de TG en los microsomas, este órgano conserva actividad GPAT únicamente en la fracción mitocondrial. Por lo tanto, esta isoenzima debe cumplir una función importante en el metabolismo de glicerolípidos, que no se limita a la síntesis de TG para su almacenamiento en las gotas de lípido o exportación a través de la excreción de lipoproteínas. Al respecto, la actividad GPAT mitocondrial podría estar involucrada en la señalización celular a través de los productos de la reacción que cataliza o también en la síntesis de fosfolípidos a través del remodelado de los TG cuya síntesis inicia.

GPAT1 está presente en los sitios de contacto que existen entre la membrana mitocondrial externa e interna pero no se halla selectivamente enriquecida en los mismos. La enzima es activa en la membrana mitocondrial externa. Además, se detecta actividad GPAT NEM resistente en las membranas asociadas a mitocondria, un compartimento subcelular donde están enriquecidas otras enzimas del metabolismo lipídico.

La actividad de GPAT1 debe estar fuertemente regulada mediante modificaciones postraduccionales, ya que existe en las mitocondrias un *pool* de enzima inactiva. Este *pool* presenta una localización específica:

se encuentra en los sitios de contacto que existen entre la mitocondria y el retículo endoplasmático. Sin embargo, la proteína alcanza su destino a través de la vía clásica de importación de proteínas mitocondriales, no sufriendo el precursor ningún tipo de clivaje al ser internalizado en la membrana mitocondrial externa. Impulsa este proceso la hidrólisis de ATP. La secuencia señal para la importación de GPAT1 hacia la mitocondria no reside en el extremo C-terminal de la proteína.

No se detectó actividad NEM sensible (debida a GPAT2) en mitocondrias puras de hígado de rata.

La actividad de GPAT1 también podría estar modulada a través de interacciones intra e intermoleculares. GPAT1 forma una estructura oligomérica en la membrana, aunque no se pudo determinar si se trata de un homo u heterooligómero. Los dominios citosólicos de GPAT1 interaccionan, probablemente a través de interacciones de tipo hidrofóbico y la pérdida del dominio C-terminal conduce a una inactivación de la enzima.

# **CAPÍTULO 8**

## **Bibliografía**



- Agarwal AK, Arioglu E, De Almeida S, Akkoc N, Taylor SI, Bowcock AM, Barnes RI, Garg A (2002) AGPAT2 is mutated in congenital generalized lipodystrophy linked to chromosome 9q34. *Nat Genet* **31**: 21-23
- Aguado B, Campbell RD (1997) Human lysophosphatidic acid acyltransferase is encoded by a gene located in the major histocompatibility complex. *Biochem Soc Trans* **25**: S597
- Ardail D, Lerme F, Louisot P (1991) Involvement of contact sites in phosphatidylserine import into liver mitochondria. *J Biol Chem* **266**: 7978-7981
- Ardail D, Lerme F, Louisot P (1991) Involvement of contact sites in phosphatidylserine import into liver mitochondria. *J Biol Chem* **266**: 7978-7981
- Ardail D, Gasnier F, Lerme F, Simonot C, Louisot P, Gateau-Roesch O (1993) Involvement of mitochondrial contact sites in the subcellular compartmentalization of phospholipid biosynthetic enzymes. *J Biol Chem* **268**: 25985-25992
- Bastida A, Fernandez-Mayoralas A, Garcia-Junceda E (2002) C-terminal truncation of alpha 1,6-fucosyltransferase from *Rhizobium* sp. does not annul the transferase activity of the enzyme. *Bioorg Med Chem* **10**: 737-742
- Bates EJ, Saggerson ED (1979) A study of the glycerol phosphate acyltransferase and dihydroxyacetone phosphate acyltransferase activities in rat liver mitochondrial and microsomal fractions. Relative distribution in parenchymal and non-parenchymal cells, effects of N-ethylmaleimide, palmitoyl-coenzyme A concentration, starvation, adrenalectomy and anti-insulin serum treatment. *Biochem J* **182**: 751-762
- Beauseigneur F, Tsoko M, Gresti J, Clouet P (1999) Reciprocal enzymatic interference of carnitine palmitoyltransferase I and glycerol-3-phosphate acyltransferase in purified liver mitochondria. *Adv Exp Med Biol* **466**: 69-78
- Bell RM, Coleman RA (1980) Enzymes of glycerolipid synthesis in eukaryotes. *Annu Rev Biochem* **49**: 459-487



- Borkenhagen LF, Kennedy EP (1957) The enzymatic synthesis of cytidine diphosphate choline. *J Biol Chem* **227**: 951-962
- Brasaemle DL (2007) The perilipin family of structural lipid droplet proteins: Stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J Lipid Res* doi:10.1194/jlr.R700014-JLR200
- Brdiczka DG, Zorov DB, Sheu SS (2006) Mitochondrial contact sites: their role in energy metabolism and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* **1762**: 148-163
- Brindley DN (1984) Intracellular translocation of phosphatidate phosphohydrolase and its possible role in the control of glycerolipid synthesis. *Prog Lipid Res* **23**: 115-133
- Brindley DN (2004) Lipid phosphate phosphatases and related proteins: signaling functions in development, cell division, and cancer. *J Cell Biochem* **92**: 900-912
- Bursten SL, Harris WE, Bomsztyk K, Lovett D (1991) Interleukin-1 rapidly stimulates lysophosphatidate acyltransferase and phosphatidate phosphohydrolase activities in human mesangial cells. *J Biol Chem* **266**: 20732-20743
- Cao J, Li JL, Li D, Tobin JF, Gimeno RE (2006) Molecular identification of microsomal acyl-CoA:glycerol-3-phosphate acyltransferase, a key enzyme in de novo triacylglycerol synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 19695-19700
- Carroll MA, Morris PE, Grosjean CD, Anzalone T, Haldar D (1982) Further distinguishing properties of mitochondrial and microsomal glycerophosphate acyltransferase and the transmembrane location of the mitochondrial enzyme. *Arch Biochem Biophys* **214**: 17-25
- Cascarano J, Montisano DF, Pickett CB, James TW (1982) Rough endoplasmic reticulum-mitochondrial complexes from rat liver. An extramitochondrial succinic dehydrogenase associated with this rough endoplasmic reticulum. *Exp Cell Res* **139**: 39-50
- Ceccaldi HJ (1989) Anatomy and physiology of digestive tract of Crustaceans Decapods reared in aquaculture. *Advances in Tropical Aquaculture* **9**: 243-259

- Chen HC, Farese RV, Jr. (2005) Inhibition of Triglyceride Synthesis as a Treatment Strategy for Obesity: Lessons From DGAT1-Deficient Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25** : 482-486
- Cheng D, Meegalla RL, He B, Cromley DA, Billheimer JT, Young PR (2001) Human acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase is a tetrameric protein. *Biochem J* **359**: 707-714
- Christie WW (2003) Lipid Analysis: isolation, identification and structural analysis of lipids -3<sup>rd</sup> Edition. The Oily Press, Bridgwater, England. ISBN 0-9531949-5-7
- Ciruzzi M (2002) Prevalencia de los factores de riesgo coronario en una muestra de la población argentina. Estudio REDIFA. *Revista Argentina de Cardiología* **70**: 300-311
- Coleman RA, Rao P, Fogelson RJ, Bardes ES (1992) 2-Bromopalmitoyl-CoA and 2-bromopalmitate: promiscuous inhibitors of membrane-bound enzymes. *Biochim Biophys Acta* **1125**: 203-209
- Coleman RA, Lewin TM, Muoio DM (2000) Physiological and nutritional regulation of enzymes of triacylglycerol synthesis. *Annu Rev Nutr* **20**: 77-103
- Coleman RA, Lewin TM, Van Horn CG, Gonzalez-Baro MR (2002) Do long-chain acyl-CoA synthetases regulate fatty acid entry into synthetic versus degradative pathways? *J Nutr* **132**: 2123-2126
- Coleman RA, Lee DP (2004) Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog Lipid Res* **43**: 134-176
- Collison LW, Jolly CA (2006) Phosphorylation regulates mitochondrial glycerol-3-phosphate-1 acyltransferase activity in T-lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* **1761**: 129-139
- Cui Z, Vance JE, Chen MH, Voelker DR, Vance DE (1993) Cloning and expression of a novel phosphatidylethanolamine N-methyltransferase. A specific biochemical and cytological marker for a unique membrane fraction in rat liver. *J Biol Chem* **268**: 16655-16663
- Dasgupta M, Blumenthal DK (1995) Characterization of the regulatory domain of the gamma-subunit of phosphorylase kinase. The two noncontiguous calmodulin-binding subdomains are also autoinhibitory. *J Biol Chem* **270**: 22283-22289

- Daum G, Vance JE (1997) Import of lipids into mitochondria. *Prog Lipid Res* **36**: 103-130
- Dircks LK, Ke J, Sul HS (1999) A conserved seven amino acid stretch important for murine mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase activity. Significance of arginine 318 in catalysis. *J Biol Chem* **274**: 34728-34734
- Donkor J, Sariahmetoglu M, Dewald J, Brindley DN, Reue K (2007) Three mammalian lipins act as phosphatidate phosphatases with distinct tissue expression patterns. *J Biol Chem* **282**: 3450-3457
- Eberhardt C, Gray PW, Tjoelker LW (1997) Human lysophosphatidic acid acyltransferase. cDNA cloning, expression, and localization to chromosome 9q34.3. *J Biol Chem* **272**: 20299-20305
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* **226**: 497-509
- Franke WW, Kartenbeck J (1971) Outer mitochondrial membrane continuous with endoplasmic reticulum. *Protoplasma* **73**: 35-41
- Fraser F, Zammit VA (1998) Enrichment of carnitine palmitoyltransferases I and II in the contact sites of rat liver mitochondria. *Biochem J* **329** ( Pt 2): 225-229
- Ganesh BB, Wang P, Kim JH, Black TM, Lewin TM, Fiedorek FT, Jr., Coleman RA (1999) Rat sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase: molecular cloning and characterization of the cDNA and expressed protein. *Biochim Biophys Acta* **1439**: 415-423
- Garavito RM, Ferguson-Miller S (2001) Detergents as tools in membrane biochemistry. *J Biol Chem* **276**: 32403-32406
- Garavito RM, Ferguson-Miller S (2001) Detergents as tools in membrane biochemistry. *J Biol Chem* **276**: 32403-32406
- Garg A, Misra A (2002) Hepatic steatosis, insulin resistance, and adipose tissue disorders. *J Clin Endocrinol Metab* **87**: 3019-3022
- Gilham D, Alam M, Gao W, Vance DE, Lehner R (2005) Triacylglycerol hydrolase is localized to the endoplasmic reticulum by an unusual retrieval sequence where it participates in VLDL assembly without utilizing VLDL lipids as substrates. *Mol Biol Cell* **16**: 984-996

- Gomez-Munoz A, Hatch GM, Martin A, Jamal Z, Vance DE, Brindley DN (1992) Effects of okadaic acid on the activities of two distinct phosphatidate phosphohydrolases in rat hepatocytes. *FEBS Lett* **301**: 103-106
- Gonzalez-Baro MR, Pollero RJ (1988) Lipid characterization and distribution among tissues of the freshwater crustacean *Macrobrachium borellii* during an annual cycle. *Comp Biochem Physiol* **91B**: 711-715
- Gonzalez-Baro MR, Irazu CE, Pollero RJ (1990) Palmitoil-CoA ligasa activity in the hepatopancreas and gill microsomes of the freshwater shrimp *Macrobrachium borelli*. *Comp Biochem Physiol* **97B**: 129-133
- Gonzalez-Baro MR, Pollero RJ (1993) Palmitic acid metabolism in the hepatopancreas of the freshwater shrimp *Macrobrachium borellii*. *Comp Biochem Physiol* **106B**: 71-75
- Gonzalez-Baro MR, Granger DA, Coleman RA (2001) Mitochondrial glycerol phosphate acyltransferase contains two transmembrane domains with the active site in the N-terminal domain facing the cytosol. *J Biol Chem* **276**: 43182-43188
- Gonzalez-Baro MR, Lewin TM, Coleman RA (2007) Regulation of Triglyceride Metabolism. II. Function of mitochondrial GPAT1 in the regulation of triacylglycerol biosynthesis and insulin action. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **292**: G1195-G1199
- Hammond LE, Gallagher PA, Wang S, Hiller S, Kluckman KD, Posey-Marcos EL, Maeda N, Coleman RA (2002) Mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase-deficient mice have reduced weight and liver triacylglycerol content and altered glycerolipid fatty acid composition. *Mol Cell Biol* **22**: 8204-8214
- Heath RJ, Rock CO (1998) A conserved histidine is essential for glycerolipid acyltransferase catalysis. *J Bacteriol* **180**: 1425-1430
- Heath RJ, Rock CO (1999) A Missense Mutation Accounts for the Defect in the Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase Expressed in the plsB26 Mutant. *J Bacteriol* **181**: 1944-1946
- Hoppel C, Kerner J, Turkaly P, Tandler B (2001) Rat liver mitochondrial contact sites and carnitine palmitoyltransferase-I. *Arch Biochem Biophys* **392**: 321-325

- Hoppel C, Kerner J, Turkaly P, Minkler P, Tandler B (2002) Isolation of hepatic mitochondrial contact sites: previously unrecognized inner membrane components. *Anal Biochem* **302**: 60-69
- Horton JD, Shah NA, Warrington JA, Anderson NN, Park SW, Brown MS, Goldstein JL (2003) Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 12027-12032
- Hovius R, Lambrechts H, Nicolay K, de Kruijff B (1990) Improved methods to isolate and subfractionate rat liver mitochondria. Lipid composition of the inner and outer membrane. *Biochim Biophys Acta* **1021**: 217-226
- Igal RA, Wang S, Gonzalez-Baro M, Coleman RA (2001) Mitochondrial glycerol phosphate acyltransferase directs the incorporation of exogenous fatty acids into triacylglycerol. *J Biol Chem* **276**: 42205-42212
- Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28
- Jamal Z, Martin A, Gomez-Munoz A, Brindley DN (1991) Plasma membrane fractions from rat liver contain a phosphatidate phosphohydrolase distinct from that in the endoplasmic reticulum and cytosol. *J Biol Chem* **266**: 2988-2996
- Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Duncan RE, Ahmadian M, Sul HS (2007) Regulation of triglyceride metabolism. IV. Hormonal regulation of lipolysis in adipose tissue. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **293**: G1-G4
- Jenkins CM, Mancuso DJ, Yan W, Sims HF, Gibson B, Gross RW (2004) Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. *J Biol Chem* **279**: 48968-48975
- Kennedy EP, Weiss SB (1956) The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides. *J Biol Chem* **222**: 193-214
- Kennedy EP (1961) Biosynthesis of complex lipids. *Fed Proc* **20**: 934-940
- Kump DS, Laye MJ, Booth FW (2006) Increased mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase protein and enzyme activity in rat

- epididymal fat upon cessation of wheel running. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **290**: E480-E489
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Langin D (2006) Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome. *Pharmacol Res* **53**: 482-491
- Lavarias S, Pollero RJ, Heras H (2006) Activation of lipid catabolism by the water-soluble fraction of petroleum in the crustacean *Macrobrachium borellii*. *Aquat Toxicol* **77**: 190-196
- Lee FJ, Pristupa ZB, Ciliax BJ, Levey AI, Niznik HB (1996) The dopamine transporter carboxyl-terminal tail. Truncation/substitution mutants selectively confer high affinity dopamine uptake while attenuating recognition of the ligand binding domain. *J Biol Chem* **271**: 20885-20894
- Lehner R, Kuksis A (1993) Triacylglycerol synthesis by an sn-1,2(2,3)-diacylglycerol transacylase from rat intestinal microsomes. *J Biol Chem* **268**: 8781-8786
- Lehner R, Cui Z, Vance DE (1999) Subcellular localization, developmental expression and characterization of a liver triacylglycerol hydrolase. *Biochem J* **338 ( Pt 3)**: 761-768
- Lewin TM, Wang P, Coleman RA (1999) Analysis of amino acid motifs diagnostic for the sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase reaction. *Biochemistry* **38**: 5764-5771
- Lewin TM, Granger DA, Kim JH, Coleman RA (2001) Regulation of mitochondrial sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase activity: response to feeding status is unique in various rat tissues and is discordant with protein expression. *Arch Biochem Biophys* **396** : 119-127
- Lewin TM, Van Horn CG, Krisans SK, Coleman RA (2002) Rat liver acyl-CoA synthetase 4 is a peripheral-membrane protein located in two distinct subcellular organelles, peroxisomes, and mitochondrial-associated membrane. *Arch Biochem Biophys* **404**: 263-270
- Lewin TM, Schwerbrock NM, Lee DP, Coleman RA (2004) Identification of a new glycerol-3-phosphate acyltransferase isoenzyme, mtGPAT2, in mitochondria. *J Biol Chem* **279**: 13488-13495

- Lewin TM, Wang S, Nagle CA, Van Horn CG, Coleman RA (2005) Mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase-1 directs the metabolic fate of exogenous fatty acids in hepatocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **288**: E835-E844
- Lewis JA, Tata JR (1973) A rapidly sedimenting fraction of rat liver endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* **13**: 447-459
- Liang CP, Tall AR (2001) Transcriptional profiling reveals global defects in energy metabolism, lipoprotein, and bile acid synthesis and transport with reversal by leptin treatment in ob/ob mouse liver. *J Biol Chem* **276**: 49066-49076
- Linden D, William-Olsson L, Rhedin M, Asztely AK, Clapham JC, Schreyer S (2004) Overexpression of mitochondrial GPAT in rat hepatocytes leads to decreased fatty acid oxidation and increased glycerolipid biosynthesis. *J Lipid Res* **45**: 1279-1288
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275
- Mannella CA, Buttle K, Rath BK, Marko M (1998) Electron microscopic tomography of rat-liver mitochondria and their interaction with the endoplasmic reticulum. *Biofactors* **8**: 225-228
- Mashek DG, McKenzie MA, Van Horn CG, Coleman RA (2006) Rat long chain acyl-CoA synthetase 5 increases fatty acid uptake and partitioning to cellular triacylglycerol in McArdle-RH7777 cells. *J Biol Chem* **281**: 945-950
- Megias A, Municio AM, Perez-Albarsanz (1977) Biochemistry of Development in Insects. *Eur. J. Biochem* **72**: 9-16
- Meier PJ, Spycher MA, Meyer UA (1981) Isolation and characterization of rough endoplasmic reticulum associated with mitochondria from normal rat liver. *Biochim Biophys Acta* **646**: 283-297
- Mihara K (2004) [Targeting and insertion of preproteins into the mitochondrial outer membrane]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **49**: 889-894
- Muoio DM, Seefeld K, Witters LA, Coleman RA (1999) AMP-activated kinase reciprocally regulates triacylglycerol synthesis and fatty acid oxidation in liver and muscle: evidence that sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase is a novel target. *Biochem J* **338 ( Pt 3)**: 783-791

- Nagle CA, An J, Shiota M, Torres TP, Cline GW, Liu ZX, Wang S, Catlin RL, Shulman GI, Newgard CB, Coleman RA (2007) Hepatic overexpression of glycerol-sn-3-phosphate acyltransferase 1 in rats causes insulin resistance. *J Biol Chem* **282**: 14807-14815
- Nelson DL, Cox MM (2005) Lehninger Principles of Biochemistry-4<sup>th</sup> edition. W.H. Freeman and Company, New York. ISBN: 978-0-7167-4339-2
- Neupert W, Herrmann JM (2007) Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem* **76**: 723-749
- Onorato TM, Chakraborty S, Haldar D (2005) Phosphorylation of rat liver mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase by casein kinase 2. *J Biol Chem* **280**: 19527-19534
- Oto T, GutholdR, Strong K (2005) WHO Global Comparable Estimates, <http://www.who.int/infobase> IBCRef: 199999
- Park H, Kaushik VK, Constant S, Prentki M, Przybytkowski E, Ruderman NB, Saha AK (2002) Coordinate regulation of malonyl-CoA decarboxylase, sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, and acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase in rat tissues in response to exercise. *J Biol Chem* **277**: 32571-32577
- Parker EM, Ross EM (1991) Truncation of the extended carboxyl-terminal domain increases the expression and regulatory activity of the avian beta-adrenergic receptor. *J Biol Chem* **266**: 9987-9996
- Parks EJ, Hellerstein MK (2000) Carbohydrate-induced hypertriacylglycerolemia: historical perspective and review of biological mechanisms. *Am J Clin Nutr* **71**: 412-433
- Paulauskis JD, Sul HS (1988) Cloning and expression of mouse fatty acid synthase and other specific mRNAs. Developmental and hormonal regulation in 3T3-L1 cells. *J Biol Chem* **263**: 7049-7054
- Petersen KF, Shulman GI (2006) Etiology of insulin resistance. *Am J Med* **119**: S10-S16
- Pollero RJ, González-Baró MR, Irazú CE (1991) Lipid classes consumption related to fasting and thermal stress in the shrimp *Macrobrachium borellii*. *Comp Biochem Physiol* **99B**: 233-238
- Rapaport D (2005) How does the TOM complex mediate insertion of precursor proteins into the mitochondrial outer membrane? *J Cell Biol* **171**: 419-423



- Reichert AS, Neupert W (2002) Contact sites between the outer and inner membrane of mitochondria-role in protein transport. *Biochim Biophys Acta* **1592**: 41-49
- Ruan H, Pownall HJ (2001) Overexpression of 1-acyl-glycerol-3-phosphate acyltransferase-alpha enhances lipid storage in cellular models of adipose tissue and skeletal muscle. *Diabetes* **50**: 233-240
- Rusinol AE, Cui Z, Chen MH, Vance JE (1994) A unique mitochondria-associated membrane fraction from rat liver has a high capacity for lipid synthesis and contains pre-Golgi secretory proteins including nascent lipoproteins. *J Biol Chem* **269**: 27494-27502
- Salach JI (1979) Monoamine oxidase from beef liver mitochondria: simplified isolation procedure, properties, and determination of its cysteinyl flavin content. *Arch Biochem Biophys* **192**: 128-137
- Sambrook, J., Fritsch, EF, Maniatis, T (1989). Molecular cloning: a laboratory manual- 3<sup>rd</sup> edition. Cold Spring Harbor Press, New York. ISBN 978-0879695767
- Sanchez-Paz A, Garcia-Carreno F, Muhlia-Almazan A, Peregrino-Uriarte AB, Hernandez-Lopez J, Yepiz-Plascencia G (2006) Usage of energy reserves in crustaceans during starvation: status and future directions. *Insect Biochem.Mol.Biol* **36**: 241-249
- Scheideler MA, Bell RM (1991) Characterization of active and latent forms of the membrane-associated sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **266**: 14321-14327
- Schulke N, Sepuri NB, Gordon DM, Saxena S, Dancis A, Pain D (1999) A multisubunit complex of outer and inner mitochondrial membrane protein translocases stabilized in vivo by translocation intermediates. *J Biol Chem* **274**: 22847-22854
- Schwer B, Ren S, Pietschmann T, Kartenbeck J, Kaehlcke K, Bartenschlager R, Yen TS, Ott M (2004) Targeting of hepatitis C virus core protein to mitochondria through a novel C-terminal localization motif. *J Virol* **78**: 7958-7968
- Shephard EH, Hubscher G (1969) Phosphatidate biosynthesis in mitochondrial subfractions of rat liver. *Biochem J* **113**: 429-440
- Shore GC, Tata JR (1977) Two fractions of rough endoplasmic reticulum from rat liver. I. Recovery of rapidly sedimenting endoplasmic reticulum in association with mitochondria. *J Cell Biol* **72**: 714-725

- Sousa LG, Cuartas EI, Petriella AM (2005) Fine structural analysis of the epithelial cells in the hepatopancreas of *Palaemonetes argentinus* (Crustacea, Decapoda, Caridea) in intermoult. *Biocell* **29**: 25-31
- Stamps AC, Elmore MA, Hill ME, Kelly K, Makda AA, Finnen MJ (1997) A human cDNA sequence with homology to non-mammalian lysophosphatidic acid acyltransferases. *Biochem J* **326 ( Pt 2)**: 455-461
- Stone SJ, Vance JE (2000) Phosphatidylserine synthase-1 and -2 are localized to mitochondria-associated membranes. *J Biol Chem* **275**: 34534-34540
- Tabor CW, Tabor H, Rosenthal SM (1954) Purification of amine oxidase from beef plasma. *J Biol Chem* **208**: 645-661
- Thuresson ER (2004) Inhibition of glycerol-3-phosphate acyltransferase as a potential treatment for insulin resistance and type 2 diabetes. *Curr Opin Investig Drugs* **5**: 411-418
- tom DH, Doring F, Fuchs D, Roth HP, Daniel H (2005) Transcriptome and proteome analysis identifies the pathways that increase hepatic lipid accumulation in zinc-deficient rats. *J Nutr* **135**: 199-205
- Truscott KN, Brandner K, Pfanner N (2003) Mechanisms of protein import into mitochondria. *Curr Biol* **13**: R326-R337
- Tuinstra RL, Burgner JW, Miziorko HM (2002) Investigation of the oligomeric status of the peroxisomal isoform of human 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase. *Arch Biochem Biophys* **408**: 286-294
- Vance JE (1990) Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *J Biol Chem* **265**: 7248-7256
- Vergnes L, Beigneux AP, Davis R, Watkins SM, Young SG, Reue K (2006) Agpat6 deficiency causes subdermal lipodystrophy and resistance to obesity. *J Lipid Res* **47**: 745-754
- Vickaryous NK, Teh EM, Stewart B, Dolphin PJ, Too CK, McLeod RS (2003) Deletion of N-terminal amino acids from human lecithin:cholesterol acyltransferase differentially affects enzyme activity toward alpha- and beta-substrate lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* **1646**: 164-172

- Vidugiriene J, Sharma DK, Smith TK, Baumann NA, Menon AK (1999) Segregation of glycosylphosphatidylinositol biosynthetic reactions in a subcompartment of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **274**: 15203-15212
- Villena JA, Roy S, Sarkadi-Nagy E, Kim KH, Sul HS (2004) Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem* **279**: 47066-47075
- Viollet B, Foretz M, Guigas B, Horman S, Dentin R, Bertrand L, Hue L, Andreelli F (2006) Activation of AMP-activated protein kinase in the liver: a new strategy for the management of metabolic hepatic disorders. *J Physiol* **574**: 41-53
- Voelker DR (2005) Bridging gaps in phospholipid transport. *Trends Biochem Sci* **30**: 396-404
- Wang S, Lee DP, Gong N, Schwerbrock NM, Mashek DG, Gonzalez-Baro MR, Stapleton C, Li LO, Lewin TM, Coleman RA (2007) Cloning and functional characterization of a novel mitochondrial N-ethylmaleimide-sensitive glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT2). *Arch Biochem Biophys* **465**: 347-358
- West J, Tompkins CK, Balantac N, Nudelman E, Meengs B, White T, Bursten S, Coleman J, Kumar A, Singer JW, Leung DW (1997) Cloning and expression of two human lysophosphatidic acid acyltransferase cDNAs that enhance cytokine-induced signaling responses in cells. *DNA Cell Biol* **16**: 691-701
- Westermann B (2003) Mitochondrial membrane fusion. *Biochim Biophys Acta* **1641**: 195-202
- Wiggins D, Gibbons GF (1992) The lipolysis/esterification cycle of hepatic triacylglycerol. Its role in the secretion of very-low-density lipoprotein and its response to hormones and sulphonylureas. *Biochem J* **284** (Pt 2): 457-462
- Yang LY, Kuksis A (1991) Apparent convergence (at 2-monoacylglycerol level) of phosphatidic acid and 2-monoacylglycerol pathways of synthesis of chylomicron triacylglycerols. *J Lipid Res* **32**: 1173-1186
- Yang LY, Kuksis A, Myher JJ, Steiner G (1995) Origin of triacylglycerol moiety of plasma very low density lipoproteins in the rat: structural studies. *J Lipid Res* **36**: 125-136

- Yeaman SJ (2004) Hormone-sensitive lipase--new roles for an old enzyme. *Biochem J* **379**: 11-22
- Yu C, Chen J, Lin S, Liu J, Chang CCY, Chang TY (1999) Human Acyl-CoA:Cholesterol Acyltransferase-1 Is a Homotetrameric Enzyme in Intact Cells and in Vitro. *J Biol Chem* **274**: 36139-36145
- Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M, Lass A, Neuberger G, Eisenhaber F, Hermetter A, Zechner R (2004) Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* **306**: 1383-1386

