



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

**TESIS
DOCTOR EN BIOQUÍMICA**

**“Las diacilglicerol quinazas en los núcleos de las células
fotorreceptoras de la retina bovina.
Efectos de la luz y de la insulina”.**

Paola Marisel Natalini

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2014

Dedicado a mis padres,
porque son mi máximo
orgullo y mi ejemplo a
seguir....

A mi directora, Moni,
porque esta tesis es el
logro de un trabajo en
equipo.

DIRECTORAS DE TESIS:

Dra. Mónica Graciela Ilincheta

Dra. Norma María Giusto

“Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Bioquímica, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Lípidos y Transducción de Señales del Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB), dependiente de la Universidad Nacional del Sur (UNS) y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) durante el período comprendido entre el 7 de diciembre de 2010 y el 10 de noviembre de 2014, bajo la dirección de la Dra. Mónica Ilincheta de Boschero, Profesora adjunta de la Universidad Nacional del Sur, y la codirección de la Dra. Norma María Giusto, Profesora emérita de la Universidad Nacional del Sur e Investigadora Principal de CONICET”.

El presente trabajo de tesis fue financiado con subsidios otorgados por el CONICET (PIP N°112-201101-00437) y por la UNS (24/B176; 24/B207). A dichas instituciones les agradezco el apoyo económico brindado para la concreción de este trabajo de tesis.

21 de noviembre de 2014

Paola Marisel Natalini

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el/...../....., mereciendo
la calificación de (.....)

Esta tesis doctoral no podría haberse concretado sin la ayuda y el apoyo de muchas personas que me acompañaron diariamente durante estos cinco años.

Le quiero agradecer a la Universidad Nacional del Sur por darme la posibilidad de estudiar una carrera de grado y de realizar un doctorado, y, además, por financiar gran parte de mis estudios de postgrado. También agradezco al CONICET por financiar otra parte de mis estudios de postgrado.

Al INIBIBB, por el soporte institucional, y a todos sus integrantes, por los momentos compartidos durante estos cinco años.

Le quiero agradecer muy especialmente a mi directora, la Dra. Mónica Ilincheta, por su calidad tanto científica como humana, por ser mi compañera, consultora, directora y mucho más, por estar siempre, en cada momento de esta tesis, ayudándome en todo sentido. Porque este logro es de ambas.

A mi codirectora, la Dra. Norma Giusto, por aceptarme en su grupo de trabajo, por estar siempre presente respondiendo a las necesidades de sus becarios y por sus enseñanzas diarias.

A las Dras. Sandra Zulian y Melina Mateos, porque además de compartir largas horas en el laboratorio, me enseñaron prácticamente todo lo que necesitaba para realizar esta tesis, y me aconsejaron en cada una de las dudas que se me plantearon, siempre presentes y dispuestas a ayudarme.

A todas las integrantes del laboratorio NMG, porque estos cinco años de convivencia fueron absolutamente amenos gracias a su compañía. Agradezco cada día que el destino me haya traído a este laboratorio, porque la calidad humana de sus integrantes es única y me sentí en todo momento como en familia.

A los integrantes del laboratorio de la Dra. Marta Aveldaño y de los Dres. Nora Rotstein y Quique Politi, nuestros vecinos, quienes demostraron gran generosidad y compañerismo en años de crisis financiera, colaborando con reactivos muy valiosos para concretar esta tesis doctoral.

A mis amigas, las integrantes de la “canastita”, Connie, Vane, Ana Clara, Vir G, Vir B, Meli, Sofi y Sandra por brindarme una valiosa amistad y por estar siempre presentes, en los malos y buenos momentos de mi vida. Gracias por poder contar con ustedes siempre.

A mis compañeras y amigas de la cátedra de Farmacotecnia II, porque compartimos muy lindos momentos juntas y siempre están dispuestas a ayudarme.

A el resto de mis amigos, porque cada uno es especial en mi vida, y están siempre cuando los necesito escuchándome, o distrayéndome.

A mi amor, Manu, por su apoyo incondicional durante estos 8 años de noviazgo y sobre todo por tolerar mi carácter en momentos de crisis. A su familia, mi familia política, porque son realmente una familia para mí y los quiero muchísimo. Y a mi familia, mis padres Néstor y Coca, y mis hermanos, Darío y Silvana, para los cuales no existen palabras de agradecimiento, porque me inculcaron los valores necesarios para desenvolverme en la vida, porque respetan cada una de mis decisiones, entre las cuales la distancia es una de las más difíciles y porque estuvieron, están y estarán en cada momento de mi vida de forma incondicional.

A los pequeños más lindos del mundo, mis sobrinos, Jere, Giuli, Tomi y Giovi, y a mis sobrinos del corazón, Lean y María Emma, que me permitieron descubrir un sentimiento hermoso, y me dieron uno de los títulos más lindos, el de tía.

Simplemente gracias a todos, cada uno hizo que esta tesis sea una experiencia inolvidable, y que mi vida esté llena de momentos felices.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	1
ABSTRACT	4
ABREVIATURAS	7
INTRODUCCIÓN	
Capítulo I	10
INTRODUCCIÓN	
Capítulo II	35
OBJETIVOS	46
MATERIALES Y MÉTODOS	49
1. Materiales	50
2. Material biológico	51
2.1 Obtención de la retina bovina	51
2.2 Protocolo de aislamiento de los núcleos	52
2.2.1 Obtención de los núcleos de la retina bovina	52
2.2.2 Obtención de los núcleos de las células fotorreceptoras de la retina bovina	53
2.2.3 Análisis comparativo de las poblaciones nucleares obtenidas por el “método tradicional” y el “método Nuevo”	55
2.2.3.1 Tinción con sondas nucleares	55
2.2.3.2 Microscopía electrónica de transmisión	55
2.2.3.3 <i>Western Blot</i>	56
3. Protocolo de exposición de las retinas bovinas a la luz	56
3.1 Incubación de las retinas bovinas con inhibidores enzimáticos y posterior exposición a la luz y a la oscuridad	57
3.2 Ensayos para determinar si el modelo de luz-oscuridad utilizado induce daño	57
3.2.1 Ensayo de detección de peroxidación lipídica en el homogenado de la retina bovina	57
3.2.2 Análisis del daño al ADN por tinción con sondas fluorescentes y observación por microscopía confocal	58
4. Ensayos enzimáticos empleados para determinar la actividad DAGK	58

4.1 Determinación de la actividad DAGK en los núcleos de la retina bovina	59
4.1.1 Obtención de DAG-[³ H] de la retina bovina	59
4.1.1.1 Incubación de las retinas	59
4.1.1.2 Extracción de los lípidos neutros	59
4.1.1.3 Separación de los lípidos por cromatografía en capa fina	60
4.1.1.4 Visualización de los lípidos	61
4.1.2 Ensayo enzimático para determinar la actividad DAGK utilizando DAG-[³ H]	62
4.2 Determinación de la actividad DAGK en los núcleos de las células fotorreceptoras de la retina bovina	63
4.2.1 Ensayo enzimático para determinar la actividad DAGK utilizando DAG-[³ H]	63
4.2.2 Ensayo enzimático para determinar la actividad DAGK utilizando ATP-[γ - ³² P]	63
4.2.2.1 Determinación de los parámetros cinéticos de las DAGK en los núcleos de las células fotorreceptoras de la retina bovina	66
4.2.2.2 Efecto de agentes tensoactivos sobre la generación de PA	67
5. Inmunodetección de proteínas por <i>Western Blot</i> (WB).	67
6. Inmunodetección de proteínas por microscopía de fluorescencia	69
7. Métodos analíticos	70
7.1 Cuantificación de la radioactividad por espectrometría de centelleo líquido	70
7.2 Cuantificación de las proteínas	71
8. Métodos estadísticos para analizar los datos experimentales	71

RESULTADOS

CAPÍTULO I. “Estudio de las DAGK en los núcleos de la retina bovina. Efectos de la luz sobre vías de señalización lipídicas en los núcleos de las células fotorreceptoras”	73
I.1 Determinación de la presencia y de la actividad DAGK en los núcleos de la retina bovina	74
I.1.1 Evaluación del modelo experimental. Pureza de la fracción nuclear de la retina bovina (FNR)	74
I.1.2 Determinación de la presencia de la DAGK ζ en los núcleos de la retina bovina	75
I.1.3 Análisis de la actividad enzimática de la DAGK ζ en los núcleos de retina bovina	77

I.1.4 Acción de la insulina sobre la actividad enzimática DAGK en los núcleos de la retina bovina	79
I.2 Estudio de las DAGK en los núcleos de las células fotorreceptoras de la retina bovina (FNF). Efectos de la luz sobre vías de señalización en la FNF	82
I.2.1 Análisis comparativo de las fracciones nucleares obtenidas por el “método tradicional” y el “método nuevo”	82
I.2.2 Caracterización de la actividad DAGK en la fracción nuclear de las células fotorreceptoras.	89
I.2.2.1 Estudio cinético de la actividad DAGK en la FNF	91
I.2.2.1.1 Determinación de la actividad DAGK en la FNF en función del tiempo de ensayo	91
I.2.2.1.2 Determinación de la actividad DAGK en función la concentración de proteínas nucleares utilizadas en el ensayo enzimático	92
I.2.2.1.3 Dependencia de la actividad DAGK con la concentración de ATP	92
I.2.2.1.4 Dependencia de la actividad enzimática DAGK con la concentración de DAG	94
I.2.2.2 Efectos de los agentes tensioactivos en la generación de PA a partir de DAG	96
I.2.3 Vías de señalización relacionadas con el metabolismo del DAG, activadas en la FNF por la exposición de las retinas a la luz	99
I.2.3.1 Análisis de marcadores de daño en la FNF proveniente de retinas expuestas a la luz o mantenidas en oscuridad	99
I.2.3.2 Efectos de la luz sobre la actividad DAGK en la FNF	101
I.2.3.3 Efectos de la luz sobre la localización de las isoformas de tipo I, de la DAGK ϵ (tipo III), de la DAGK ζ (Tipo IV) y de la DAGK θ (tipo V) en la FNF.	104
I.2.3.4 Efectos de la luz sobre la actividad de la DAGK ζ y de la DAGK ϵ en la FNF	106
I.2.3.5 Efectos de la luz sobre la PKC α	108
I.2.3.6 Rol de las DAGK en la regulación del estado de fosforilación de la PKC α por luz.	110
I.2.3.7 Regulación de la actividad DAGK por las PKC en las FNF provenientes de las retinas bovinas expuestas a la luz o a la oscuridad	112
I.2.3.8 Rol de la PIP ₂ -PLC sobre la actividad DAGK en las FNF provenientes de las retinas bovinas expuestas a la luz o a la oscuridad	113

I.2.3.9 Rol de la PIP ₂ -PLC sobre el contenido y estado de fosforilación de la PKC α en la FNF de retinas bovinas expuestas a la luz o a la oscuridad.	116
---	-----

RESULTADOS

CAPÍTULO II. “Activación de vías de señalización de insulina y sus efectos a nivel nuclear en condiciones de luz u oscuridad” **119**

II.1 Análisis de los efectos de la luz sobre vías de señalización relacionadas con la insulina	120
--	-----

II.2 Análisis de los efectos de la insulina sobre la actividad DAGK en los núcleos de las células fotorreceptoras	122
---	-----

II.2.1 Efectos directos e indirectos de la insulina sobre la actividad DAGK	122
---	-----

II.2.2 Acciones directas de la insulina sobre la actividad DAGK y la fosforilación de los polifosfoinosítidos en los núcleos de las células fotorreceptoras	124
---	-----

II.2.3 Acciones directas de la insulina 0,8 μ M sobre la actividad DAGK en los núcleos de las células fotorreceptoras	129
---	-----

II.2.4 Potenciación por vanadato de los efectos de la insulina sobre la actividad DAGK y la fosforilación de los polifosfoinosítidos en la FNF	131
--	-----

II.3 Análisis de la presencia del receptor de insulina en los núcleos de la retina	134
--	-----

II.4 Efectos de la luz sobre el contenido del receptor de insulina en los núcleos de las células fotorreceptoras	136
--	-----

II.5 Efectos de la insulina sobre el contenido del receptor de insulina en las FNF de las retinas expuestas a la luz	139
--	-----

II.6 Efectos de la insulina sobre el contenido y el estado de fosforilación de ERK1/2 en las FNF de las retinas bovinas expuestas a la luz	140
--	-----

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Capítulo I	144
-------------------	------------

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Capítulo II	156
--------------------	------------

RESUMEN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES	164
---	------------

REFERENCIAS	171
--------------------	------------

PUBLICACIONES ORIGINADAS DE ESTA TESIS	187
---	------------

PRESENTACIONES A CONGRESOS	188
-----------------------------------	------------

El diacilglicerol (DAG) es un importante intermediario en la síntesis de muchas clases de lípidos, y es, además, un segundo mensajero producido en respuesta a diversos estímulos extracelulares, capaz de modular la actividad de numerosas enzimas. Una de las vías de metabolización del DAG es la fosforilación llevada a cabo por las DAGK, para dar ácido fosfatídico (PA). El ácido fosfatídico es también un importante segundo mensajero lipídico involucrado en una gran variedad de respuestas celulares.

Dada la importancia fisiológica del DAG y del PA como segundos mensajeros lipídicos, y, teniendo en cuenta los numerosos resultados que indican la presencia de las vías de señalización responsables de la síntesis y degradación de estos segundos mensajeros a nivel nuclear, iniciamos nuestros estudios analizando la actividad de las DAGK en los núcleos de la retina bovina, proyectando la investigación hacia la interpretación de su participación en las funciones esenciales de la retina, la recepción y transmisión de la luz. Además, analizamos a nivel nuclear, en las células fotorreceptoras de la retina, los efectos de la insulina, un reconocido protector del sistema nervioso central (SNC) y modulador de la actividad DAGK en otros tipos celulares del SNC.

Mediante un protocolo diseñado en nuestro laboratorio, obtuvimos a partir de la retina entera una fracción nuclear enriquecida en los núcleos de las células fotorreceptoras (FNF). En esta fracción nuclear, se pudo detectar actividad DAGK, transformadora del DAG endógeno y exógeno. Se determinó linealidad en función del tiempo de ensayo, el contenido proteico de la fracción nuclear y se analizaron parámetros cinéticos aparentes (K_m y V_{max} para cada sustrato). Los resultados con detergentes y sustratos diferentes permitieron sugerir la coexistencia de varios tipos de DAGK. Esto fue confirmado por *Western Blot* (WB) y se detectaron, además, efectos significativos en el contenido nuclear de estas isoformas por efecto de la luz (aumento de la DAGK ζ y disminución de las DAGK ϵ , β y θ).

Nuestros hallazgos se reforzaron con ensayos enzimáticos en los que se utilizaron condiciones selectivas (preferenciales) para medir la actividad de las isoformas ζ y ϵ .

En ellos se observó, por efecto de la exposición de las retinas a la luz, una fuerte correlación entre los cambios en el contenido y la actividad de ambas isoformas en la FNF.

Se demostró asimismo que el aumento de la actividad DAGK nuclear en respuesta a la luz es dependiente de la actividad PIP₂-PLC, y se observó que dicho incremento en la condición lumínica no es debido exclusivamente a un aumento del sustrato de la reacción enzimática, DAG, sino que también participa en la activación del PIP₂.

También demostramos la presencia de la PKC α en la FNF, PKC de tipo convencional que es activada en presencia de Ca²⁺ y DAG. La exposición de las retinas a la luz produjo un aumento del estado de fosforilación de la PKC α .

Dado que la fosforilación de PKC puede ser mediada por la activación de PDK1, que es dependiente de la activación previa de PI3K, enzima participante de la vía de señalización de insulina, el siguiente objetivo fue determinar la presencia de los principales componentes de las vías de señalización de insulina en la FNF. Nuestros resultados demostraron la presencia de Akt total y en su estado fosforilado (proteína quinasa de la vía de la PI3K), y de ERK1/2, pERK1/2 y p38 fosforilada (quinasas correspondientes a la vía de las MAPK). Nuestros estudios demostraron, además, que la exposición de las retinas bovinas a la luz produce un aumento en el estado de fosforilación de Akt, y que induce la translocación de ERK1/2 activada a la FNF.

Por otro lado, al analizar los efectos directos e indirectos de la insulina sobre la actividad DAGK nuclear en la FNF de retinas expuestas a la luz o a la oscuridad, fue posible demostrar que la insulina es capaz de modular la actividad DAGK nuclear tanto de forma directa (incubación de los núcleos aislados con insulina) como de manera indirecta (incubación de las retinas bovinas con insulina y posterior análisis de la actividad DAGK en la FNF). Además, se observó que la insulina cumple un rol en los cambios de la actividad DAGK nuclear en respuesta a la luz, y que los efectos de la insulina sobre la actividad DAGK son dependientes de su concentración (los efectos

se incrementan con un aumento concomitante de la concentración de insulina empleada en el ensayo enzimático).

Teniendo en cuenta los efectos directos de la insulina sobre la actividad DAGK nuclear, analizamos la presencia del receptor de insulina en la FNF por WB e inmunofluorescencia (IF) y demostramos la presencia del mismo en los núcleos de las células fotorreceptoras. Un hallazgo de particular interés fue el de haber demostrado que el contenido del RI aumenta en la FNF cuando las retinas bovinas son expuestas a la luz, lo cual sugiere que la luz puede ser un estímulo capaz de promover la translocación del RI al núcleo de las células fotorreceptoras.

Por último, analizamos si la insulina es capaz de participar en la translocación del receptor de insulina al núcleo de las células fotorreceptoras y de mediar la activación de las vías de señalización activadas por la misma a nivel nuclear. Nuestros resultados indicaron que la insulina produce un aumento en el contenido del receptor de insulina nuclear con respecto a la condición luz en ausencia de hormona. Además, la insulina produjo un aumento de ERK1/2 activado en la FNF.

En conclusión, nuestros resultados demostraron por primera vez que la exposición de las retinas bovinas a su estímulo natural, la luz, paralelamente a la activación de la típica vía de la fototransducción que se inicia en los segmentos externos, induce a nivel nuclear, la activación de distintas vías de señalización responsables de funciones críticas para la célula, y que a nivel nuclear, pueden intervenir en la transcripción de genes. Nuestros resultados demostraron también que la luz y la insulina son capaces de intervenir en la translocación del receptor de insulina desde la membrana plasmática hacia el núcleo de las células fotorreceptoras, y que la insulina promueve la activación de vías de señalización tanto de forma indirecta, actuando sobre la retina entera, como directa a nivel nuclear, sugiriendo para este último caso que mediaría sus efectos a través de la población nuclear de dicho receptor.

Diacylglycerol (DAG) is an important intermediate in the synthesis of several types of lipids, and it is also a second messenger produced in response to various extracellular stimuli, with the ability to modulate the activity of numerous enzymes.

One route of metabolism of DAG is phosphorylation by DAGK to yield phosphatidic acid (PA). PA is also an important lipid second messenger that has been involved in a variety of cellular responses.

Given the physiological importance of DAG and PA as lipid second messengers and taking into account the many results that indicate the presence of the signaling pathways responsible for the synthesis and degradation of these second messengers at the nuclear level, we initiated our studies assessing the activity of DAGK in the nuclei of bovine retina, projecting them to the interpretation of their participation in the essential functions of the retina, the receipt and transmission of light. We also analyzed at the nuclear level in retina photoreceptor cells, the effects of insulin, a known protector of the central nervous system (CNS) and DAGK activity modulator in other cell types of the CNS.

Using a protocol designed in our laboratory, we obtained from the entire retina a nuclear fraction enriched in photoreceptor cell nuclei (PNF). In the nuclear fraction, DAGK activity could be detected, which is responsible for the transformation of endogenous and exogenous DAG. A linear response was obtained as a function of protein content of the nuclear fraction and as a function of time. The apparent kinetic parameters (V_{max} and K_m for each substrate) were also determined. The results derived from the different substrates and detergents used suggest the coexistence of various types of DAGK. This was confirmed by *Western Blot* (WB), and significant effects were detected in the nuclear content of these isoforms by the effect of light (increased of DAGK ζ and decreased of DAGK ϵ , β and θ).

Our findings were strengthened by further enzyme assays using selective conditions to measure the activity of ϵ and ζ isoforms in which, due to the exposure of retina to light,

a strong correlation was observed between changes in the content and the activity of both isoforms in the PNF.

It was also demonstrated that the increase in nuclear DAGK activity in response to light is dependent on PIP₂-PLC activity and that this increase in light condition is not due only to an increase of the substrate of the enzymatic reaction, DAG, but also to the fact that PIP₂ participates in DAGK activation.

We also showed the presence of PKC α in FNF, conventional PKC which is activated in the presence of Ca²⁺ and DAG. Retina light exposure produced an increase in the phosphorylation status of PKC α .

In addition, because phosphorylation of PKC could be mediated by the activation of PDK1, which is dependent on the prior activation of PI3K, an enzyme participant of insulin signaling pathway, our second main objective in the present study was to determine the presence of the main components of the insulin signaling pathway in PNF. Our results showed the presence of total Akt and its phosphorylated state (protein kinase of PI3K pathway) and ERK1/2, pERK1/2 and phospho-p38 (components of the MAP kinases pathway). Our results also showed that light exposure to bovine retinas causes an increase in the phosphorylation status of Akt and induces the translocation of ERK1/2 activated to PNF.

In assessing the direct and indirect effects of insulin on nuclear DAGK activity in the FNF from retinas exposed either to light or darkness, it was demonstrated that insulin can modulate DAGK activity nuclear both directly (the incubation of isolated nuclei with insulin), and indirectly (the incubation of bovine retinas with insulin and the subsequent analysis of the DAGK activity in the FNF). We also observed that insulin has a role in the changes of nuclear DAGK activity in response to light, and that these effects on DAGK activity are dependent on its concentration (the effects are increased with a concomitant increase in the insulin concentration used in the enzyme assay).

Taking into account the direct effects of insulin on nuclear DAGK activity, we analyzed the presence of the insulin receptor in the FNF by WB and IF and we could

demonstrate its presence in the nuclei of photoreceptor cells. One finding of particular interest was to have shown that the contents of RI increase in FNF when bovine retinas are exposed to light, thus suggesting that light can be a stimulus capable of promoting the translocation of RI to the nucleus of the photoreceptor cells.

Finally, we examined whether or not insulin is able to participate in insulin receptor translocation to the nucleus of the photoreceptor cells and to mediate the activation of signaling pathways related with insulin at the nuclear level. Our results indicated that insulin causes an increase in the content of the nuclear insulin receptor with respect to light condition in the absence of the hormone. Furthermore, incubation of PNF with insulin resulted in an increase of nuclear, activated ERK1/2.

Summing up, our results demonstrate for the first time that light exposure of bovine retinas, its natural stimulus, in parallel to the typical activation of phototransduction pathways which starts in the outer segments, induces, at the nuclear level, the activation of different signaling pathways known to be responsible for critical functions to the cell, as gene transcription. Our results also reveal that light and insulin are involved in the translocation of the insulin receptor from the plasma membrane to the nucleus of the photoreceptor cells. Insulin also promotes the activation of cell signaling pathways, thus indirectly acting on the retina, or directly in the nucleus, suggesting that it mediates their effects through a nuclear population of the insulin receptor.

ADN	Ácido desoxiribonucleico.
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosina trifosfato
BAFI	Buffer de alta fuerza iónica
BSA	Albúmina sérica bovina
BIM	Bis-indolmaleimida
CaCl ₂	Cloruro de calcio
DAG	Diacilglicerol
DAGK	Diacilglicerol quinasa
DCNa	Deoxicolato de sodio
DMSO	Dimetil sulfóxido
DOG	1,2-dioleoilglicerol
DOPS	1,2 dioleoilfosfatidilserina
DTT	Ditiotreitol
FL	Fosfolípidos
FNF	Fracción nuclear de las células fotorreceptoras
FNR	Fracción nuclear de la retina
GDP	Guanosina 5'-difosfato
GMP _c	Guanosina monofosfato cíclico.
GTP	Guanosina 5'-trifosfato
IF	Inmunofluorescencia
IHQ	Inmunohistoquímica
IP ₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
kDa	Kilodalton
K _M	Constante aparente de Michaelis Mentel
M	Molar
mM	Milimolar
μM	Micromolar
MAG	Monoacilglicerol
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MET	Microscopía electrónica de transferencia
min	Minutos
nM	Nanomolar
nm	Nanometros
NaF	Fluoruro de sodio

OG	β octilglucósido
PA	Ácido fosfatídico
PAPasa	Fosfatidato fosfohidrolasa
PC	Fosfatidilcolina
PF	Paraformaldehído
PIP ₂	Fosfatidilinositol bifosfato
PI3K	Fosfoinosítido-3-quinasa
PKC	Proteína quinasa C
pPKC	Proteína quinasa C fosforilada
PLC	Fosfolipasa C
PMA	13-acetato, 12-miristato de forbol
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoruro
PPI	Polifosfoinosítidos
Prot	Proteínas
PS	Fosfatidilserina
RI	Receptor de insulina
ROS	Segmentos externos de bastones retinianos
RTK	Receptores tirosina quinasa
R59022	6-(2-(4-[(4-fluorofenil)fenilmetileno]-1-piperidinil) etil)-7-metil-5H-tiazol (3,2-a) pirimidin-5-ona
SAG	1-estearoil, 2-araquidonoilglicerol
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TLC	Cromatografía en capa fina
Tritón X-100	Octil fenol etoxilato, polioxietilen octil fenil éter.
V _{máx}	Velocidad máxima
Vto	Orto vanadato de sodio
WB	Western Blot

INTRODUCCIÓN

Capítulo I: Estudio de las DAGK en los núcleos de las células fotorreceptoras. Su relación con PIP_2 -PLC y PKC, enzima generadora y enzima regulada por DAG, respectivamente. Efectos de la luz a nivel nuclear.

La retina de los vertebrados.

La retina es una parte integral del sistema nervioso central (SNC). Tanto la retina como el cerebro se desarrollan a partir del mismo tejido y están constituidos por células con gran similitud estructural y funcional, por lo que presentan propiedades fisiológicas y bioquímicas similares. Por lo tanto, la retina constituye un excelente modelo para el estudio de procesos fisiológicos y patológicos del SNC, que ofrece importantes ventajas técnicas con respecto al cerebro, dado que presenta una arquitectura más simplificada.

La retina de los vertebrados es un tejido altamente especializado y sensible a la luz, que contiene células fotorreceptoras conectadas a una red neural cuya principal función es procesar la información visual. Este tejido está constituido por seis tipos celulares neuronales básicos: las células fotorreceptoras, las células bipolares, las células horizontales, las células amacrinas, las células interplexiformes y las células ganglionares. Existen, además, células gliales que rodean a las células neuronales, conocidas como células de Müller. Un tipo celular totalmente relacionado con la retina, tanto en el aspecto espacial como funcional, son las células del epitelio pigmentario. El epitelio pigmentario es una monocapa de células epiteliales que está situado entre los coriocapilares y la retina, separado de las células de la retina por una red vascular localizada en la esclera (Figura 1). Estas células poseen una cara interna interdigitada con el extremo distal de los segmentos externos de las células fotorreceptoras. Sus principales funciones son: regular los movimientos de nutrientes y metabolitos a través del espacio entre fotorreceptores, fagocitar a los discos membranosos de los segmentos externos de los fotorreceptores, intervenir en el reciclaje del retinal,

principal componente del ciclo visual, y en la secreción de varios factores visuales, esenciales para la integridad estructural de la retina.

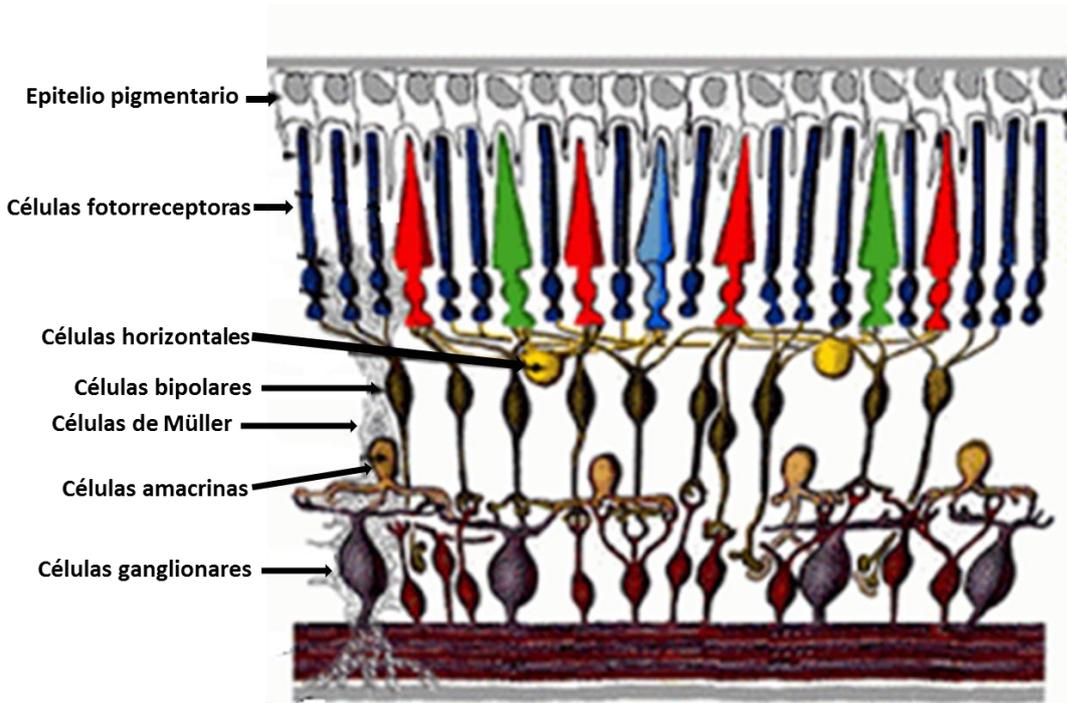


Figura 1. Representación esquemática de los tipos celulares constituyentes de la retina de los vertebrados.

Los fotorreceptores son células altamente especializadas, sensibles a la luz, que exhiben características fisiológicas únicas. En ellas, la energía lumínica es transformada en una señal química que se transmite a través de las células bipolares hacia las células ganglionares, cuyos axones (que conforman el nervio óptico), envían la información visual hacia la corteza visual primaria en el cerebro.

En los vertebrados, las células fotorreceptoras se clasifican en dos clases principales en base a sus diferencias morfológicas y funcionales: los bastones y los conos. El ojo humano contiene aproximadamente 120 millones de bastones y alrededor de 6 millones de conos. Ambos son elongados y están alineados en la dirección de la entrada de la luz. Las principales diferencias entre ellos son, que los bastones tienen una baja resolución espacial, pero son extremadamente sensibles a la luz, por lo que son responsables de la visión nocturna; en cambio, los conos tienen una alta

resolución espacial, pero son unas 100 veces menos sensible a la luz que los bastones. Los conos son los responsables de la visión diurna y en color. También existen diferencias en la dimensión de los segmentos externos de ambos, siendo mayor la de los bastones (Gordon y Bazan, 1997) (Figura 2).

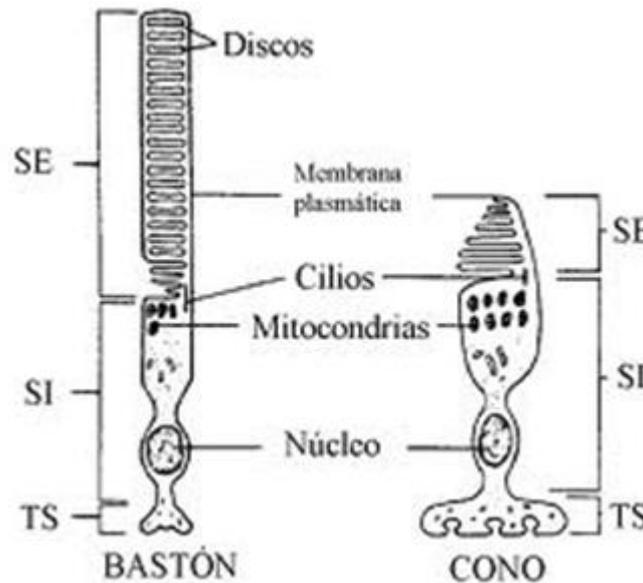


Figura 2. Esquema representativo de las células fotorreceptoras de la retina: Los bastones y los conos.

Los fotorreceptores maduros son neuronas altamente polarizadas que contienen cinco compartimientos distintos: el segmento externo, el segmento interno, una zona ciliar fina (responsable de la unión entre los segmentos externo e interno), el cuerpo celular y el terminal sináptico (Figuras 2 y 3).

El segmento externo de las células fotorreceptoras comprende un conjunto de muchos cientos de discos densamente empaquetados, rodeados de una membrana plasmática. En dichos discos, constituidos por una doble capa de membrana plasmática plegada, se lleva a cabo la cascada de la fototransducción. Por su parte, en el segmento interno se encuentra la mayor parte de la maquinaria metabólica de la célula fotorreceptora, incluyendo el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi y las mitocondrias. El intercambio o transporte de metabolitos y compuestos celulares entre

el segmento interno y externo se produce a través del cilio conector. El núcleo de las células fotorreceptoras se localiza en el cuerpo celular.

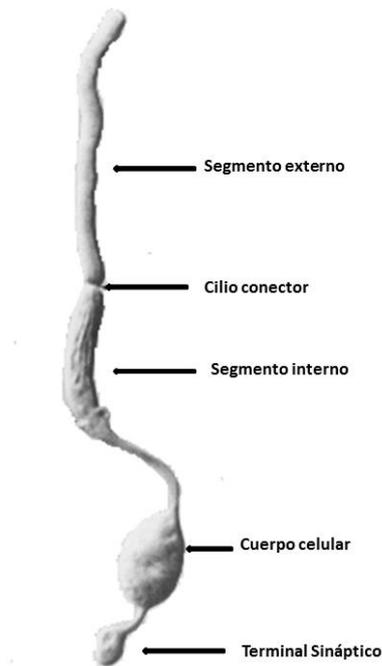


Figura 3. Imagen de las partes constituyentes de la célula fotorreceptora (obtenida por microscopía de luz).

El Mecanismo de la fototransducción.

La luz debe atravesar varios componentes del ojo, entre ellos, la córnea, el humor acuoso, el cristalino, el humor vítreo, y las distintas capas de la retina, para llegar a las células fotorreceptoras.

El proceso de la fototransducción visual en los vertebrados comienza con la absorción de un fotón de luz por parte de la rodopsina (un pigmento visual situado en los discos membranosos de los segmentos externos) y culmina en una alteración de la conductancia de la membrana plasmática de los fotorreceptores, de un estado despolarizado a un estado hiperpolarizado (Figura 4). Estos dos eventos están ligados a través de una maquinaria de señalización bioquímica altamente sofisticada y elegantemente organizada (Burns y Arshavsky, 2005). El estímulo químico que se genera en respuesta a este proceso se transmite de manera secuencial desde las

células fotorreceptoras hacia las células bipolares, y desde éstas, hacia las células ganglionares, para finalmente ser transmitido al cerebro a través del nervio óptico. Esta información puede ser modificada por señales provenientes de las células horizontales o amacrinas.

El pigmento visual rodopsina, presente en las membranas de los discos membranosos en una alta densidad, está constituido por la proteína opsina y el cromóforo 11-cis-retinal. Por absorción de un fotón de energía, se produce la isomerización de su cromóforo 11-cis-retinal a todo-trans-retinal; en ese estado, el complejo opsina-cromóforo es también conocido como metarodopsina II o R*. La rodopsina activada (R*), activa a la proteína G heterotrimérica transducina, lo que conduce a la disociación de sus subunidades $\alpha\beta\gamma$, al intercambio GDP/GTP en la subunidad α de la misma, y a la consecuente estimulación de la actividad de la fosfodiesterasa dependiente de GMPc, lo que produce un incremento de la hidrólisis de GMPc en el citoplasma del fotorreceptor. En oscuridad, el GMPc citoplasmático se une y estabiliza el estado abierto de los canales catiónicos activados por este nucleótido, ubicados en la membrana plasmática de los segmentos externos de los bastones. Estos canales iónicos abiertos, que permiten la entrada de Na^+ y Ca^{2+} , mantienen a la célula parcialmente despolarizada y en esta condición, se produce la liberación del neurotransmisor excitatorio glutamato en el terminal sináptico de las células fotorreceptoras. Durante la exposición a la luz, la activación de la cascada de la fototransducción provoca una disminución en la concentración de GMPc, y esto conduce a una reducción en la frecuencia de apertura de los canales catiónicos, lo cual genera una disminución de los niveles de Ca^{2+} y Na^+ , una hiperpolarización de la membrana, y la consecuente disminución de la liberación de glutamato por estas células (Koch y Kaupp, 1985).

La interrupción del proceso de la fototransducción, debido a la disminución de los niveles de Ca^{2+} , involucra varios mecanismos, siendo uno de los más importantes la fosforilación de la rodopsina fotoactivada por una rodopsina quinasa (la cuál para ser

activada debe previamente separarse de la recoverina). El proceso es seguido por su unión a una proteína soluble denominada arrestina, responsable del bloqueo de la interacción entre la rodopsina y la transducina. La proteína G transducina es inactivada por la hidrólisis de GTP, y por la reasociación de sus subunidades $\alpha\beta\gamma$, que constituyen el complejo inactivo. La hidrólisis de GTP es acelerada por una proteína RGS9 β 5, activadora de la actividad GTPasa. El GMP cíclico es resintetizado por una guanilato ciclasa de las células fotorreceptoras de la retina, cuya actividad es regulada por una proteína (GCAP) que cuando tiene calcio unido es inactiva (Slepak y Hurley, 2008). Un mecanismo adicional para la inactivación de la señal es la migración de las proteínas implicadas en la fototransducción. Aunque la translocación de proteínas entre membranas es un proceso celular conocido, resulta muy llamativo en esta célula altamente polarizada y compartimentalizada. En particular, las proteínas ligadas a la fototransducción, como las subunidades α y $\beta\gamma$ de la Transducina, la Arrestina y la recoverina, se movilizan en forma diferente. La migración de la subunidad α de la transducina, que activa a la fosfodiesterasa de GMPc, hacia el segmento interno de los fotorreceptores asegura la desensibilización del sistema (Sokolov y col., 2002).

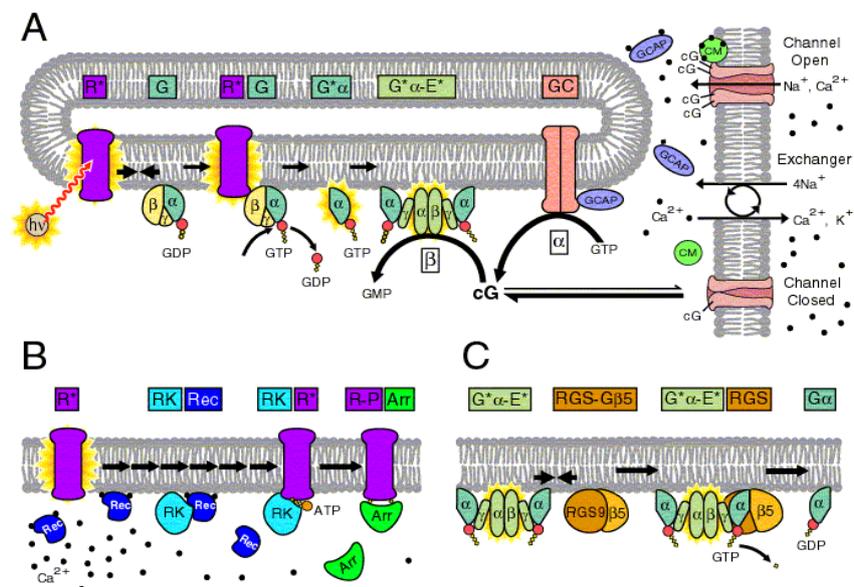


Figura 4. Esquema representativo de los componentes celulares implicados en el proceso de la fototransducción. A Cascada de activación del proceso de la fototransducción. B y C, Mecanismos de interrupción del proceso de la fototransducción (adaptado de Pugh y Lamb).

Vías de señalización relacionadas con lípidos estudiadas en la retina de los vertebrados.

Muchos grupos de investigación han reportado que existen componentes lipídicos involucrados en funciones de señalización en los segmentos externos (ROS) de las células fotorreceptoras, y que la función que ejercen estos componentes es modulada por la luz. Las membranas de los ROS están compuestas por un 50 % de proteínas y un 50 % de lípidos (Fliesler y Anderson, 1983). Los fosfolípidos y el colesterol representan cerca del 90-95 % y el 4-6 % de los lípidos totales, respectivamente. Se ha reportado que los fosfolípidos con un alto grado de insaturación son metabólicamente activos y cumplen importantes roles en la generación de mediadores fisiológicos.

Se han identificado una gran variedad de enzimas cuya actividad está relacionada con el recambio de los fosfolípidos en los ROS, tales como la fosfolipasa C (PLC) (Ghalayini y col., 1991; Ghalayini y col., 1998; Giusto y col., 2000), la fosfolipasa A2 (PLA2) (Castagnet y Giusto, 1993), la fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa (PEMT) (Roque y Giusto, 1995), la diacilglicerol quinasa (DAGK) (Huang y col., 2000; Ilincheta de Boschero y Giusto, 1992), la lípido fosfato fosfatasa (LPP) (Pasquare de Garcia y Giusto, 1986) la diacilglicerol lipasa (DAGL) (Castagnet y col., 1998; Pasquare y Giusto, 1993); la fosfatidilinositol sintasa (Ghalayini y Anderson, 1995), la fosfoinosítido-3-quinasa (PI3K) (Guo y col., 1997; Rajala y col., 2002) y la fosfolipasa D (PLD) (Salvador y Giusto, 2006). Resultados previos de nuestro laboratorio indicaron que las actividades de varias de las enzimas antes mencionadas son ampliamente moduladas por la luz. Las actividades de la PLD y de la LPP son inhibidas por la luz, mientras que las actividades de la DAGK, la PLA2 y la PEMT son estimuladas por la luz. Los resultados indican que los niveles de DAG y PA (sustrato y producto de las PLD, LPP y DAGK, antes mencionadas) tienen relevancia fisiológica en los ROS bajo condiciones de iluminación (Giusto y col., 2010). Nuestro grupo de trabajo ha

demostrado que la modulación por luz de la PLD y la DAGK, dos de las enzimas participantes en la remodelación de glicerolípidos, implica, en el caso de la PLD, la movilización desde los segmentos externos hacia los segmentos internos de RhoA (proteína G pequeña activadora de la enzima) y la movilización en sentido opuesto de la DAGK ϵ (Salvador y Giusto, 2006; Natalini y col., 2013). Estas modificaciones en la distribución de un activador de PLD (RhoA) y de la propia DAGK ϵ inducidas por la luz, que explican la menor y mayor actividad de las enzimas mencionadas, transcurren en paralelo a la translocación de las proteínas participantes en la fototransducción, como lo son la transducina, la arrestina y la recoverina, que estarían involucradas en el proceso de adaptación a la luz (Burns y Arshavsky, 2005).

Datos recientes indican que la movilización de la Arrestina hacia el segmento externo se encuentra asociada a la activación de PLC y de PKC y es dependiente de energía (Orisme y col., 2010). Los autores sugieren que la translocación de la arrestina se inicia con la activación de la rodopsina por la luz pero que no se relaciona con la cascada de activación de la transducina.

A estos hallazgos se suman los estudios que demostraron que la luz induce la fosforilación en los residuos de tirosina del receptor de insulina en los bastones retinianos, y conduce a la activación de la PI3K (Rajala y col., 2002). Los autores demostraron que la activación de la vía depende del fotoblanqueo de la rodopsina pero que es independiente de la activación de la transducina (Rajala y col., 2007). Estas observaciones condujeron a los autores a hipotetizar que la fosforilación del receptor de insulina de la retina podría ser modulada por un factor soluble de la retina e identificaron a la proteína Grb14, que se une a varios receptores tirosina quinasa, incluyendo el RI (Rajala y col., 2005). Luego, demostraron que la luz participa en la movilización de Grb14. Esta proteína se localiza predominantemente en el segmento interno, la capa nuclear y el botón sináptico en los bastones adaptados a la oscuridad, mientras que se redistribuye a lo largo de toda la célula, incluyendo los segmentos externos, cuando los bastones son expuestos a la luz (Rajala y col., 2009). La

translocación de Grb14 requiere de la fotoactivación de la rodopsina, pero no de una interacción directa con la rodopsina. Tampoco es dependiente de la señalización responsable de la fototransducción (Rajala y col., 2009).

Coincidentemente, ambos grupos de trabajo apuntan a que la luz y la activación de la rodopsina generan vías de señalización paralelas a la de la fototransducción, ligadas ambas al metabolismo de los fosfoinosítidos.

Un dato central que ha impulsado los estudios presentados en esta tesis es la evidencia que demostró la movilización de la DAGK ϵ dependiente de la luz, desde el segmento interno hacia el segmento externo en un modelo de luz-oscuridad desarrollado en ratas en cautiverio (Natalini y col., 2013). En los estudios de inmunohistoquímica, no solo se detectó claramente un enriquecimiento de la DAGK ϵ en el segmento externo por acción de la luz, sino que también se pudo determinar la movilización de la arrestina. Estos hallazgos fueron confirmados en el modelo de la retina bovina, por exposición de la copa del ojo a la luz, y el posterior aislamiento de los segmentos externos, mediante detecciones de IF y WB. La observación realizada en las imágenes de IHQ permitió evidenciar que por acción de la luz también se produce una modificación en la distribución de la DAGK ϵ en la capa nuclear externa, constituida por los núcleos de los fotorreceptores.

En la actualidad no existe en la bibliografía información sobre las vías de señalización activadas por la luz en los núcleos de la retina de los vertebrados. Este hecho nos condujo a la investigación presentada en esta tesis doctoral.

El núcleo de la célula de los vertebrados.

En las células, el núcleo se encuentra separado del citoplasma por una envoltura nuclear que comprende las membranas externa e interna, dispuestas en paralelo una sobre la otra. Ambas membranas son bicapas fosfolípicas. La membrana nuclear externa es una extensión del retículo endoplasmático y contiene ribosomas, mientras

que la membrana nuclear interna contiene proteínas específicas (nesprina, emerina, el receptor de lamina B, etc) quiénes unen la lamina nuclear y la cromatina (Marmioli y col., 2009). La envoltura nuclear es atravesada por los poros nucleares (Doucet y Hetzer, 2010), los cuáles proporcionan canales acuosos que están compuestos por múltiples proteínas que colectivamente se conocen como nucleoporinas. Estos permiten el libre paso de pequeñas moléculas hidrosolubles, mientras que evitan que las moléculas de mayor tamaño, tales como los ácidos nucleicos o las proteínas de alto peso molecular, entren o salgan de manera inadecuada. Las moléculas de mayor tamaño, en lugar de ello, deben ser transportadas al núcleo de forma activa, en un proceso mediado por una familia de factores de transporte conocidos como carioferinas. Entre éstas se encuentran las importinas, que intervienen en el transporte en dirección al núcleo, y las que realizan el transporte en sentido contrario, que se conocen como exportinas.

La lamina nuclear es una proteína filamentosa de malla intermedia que está anclada a la membrana nuclear interna y que proporciona soporte estructural al núcleo e interactúa directamente con la cromatina (Kind y van, 2010).

El núcleo celular contiene la mayor parte del material genético celular. La cromatina es el conjunto de ADN, histonas y proteínas no histónicas que se encuentran en el núcleo de las células eucariotas y que constituye el genoma de dichas células. Existen dos tipos de cromatina, la eucromatina, que es la forma de ADN menos compacta, y que contiene los genes que son frecuentemente expresados por la célula (Ehrenhofer-Murray, 2004) y la heterocromatina, que es la forma más compacta, y contiene el ADN que se transcribe de forma infrecuente.

En cuanto a la distribución de ambos tipos de cromatina en los núcleos de los fotorreceptores de la retina, se ha demostrado que la arquitectura nuclear de los bastones difiere entre los animales diurnos y nocturnos. Los bastones de las retinas de los animales diurnos poseen la arquitectura convencional encontrada en la mayoría de las células eucariotas en la cual la heterocromatina se sitúa en la periferia nuclear

mientras que la eucromatina se localiza en el interior nuclear. En el caso de los bastones de la retina de animales nocturnos como el ratón, observaron un patrón invertido donde la heterocromatina se localiza en el centro del núcleo mientras que la eucromatina se sitúa en la periferia nuclear. Llamativamente, solo los núcleos de los bastones bovinos tuvieron un patrón intermedio, en el cual en algunos sectores la eucromatina alcanza la periferia nuclear, y en otras áreas la heterocromatina se sitúa en la periferia nuclear, disposición conocida como “en rueda de carro” (Solovei y col., 2009).

A nivel molecular, las células fotorreceptoras expresan preferencialmente genes específicos que son esenciales para sus funciones, también llamados genes específicos de fotorreceptores. Las mutaciones de muchos de estos genes específicos de fotorreceptores pueden causar enfermedades degenerativas de la retina en los humanos (Hartong y col., 2006). Además, los niveles de expresión de estos genes deben ser precisamente regulados, dado que son los responsables del adecuado desarrollo y diferenciación de los fotorreceptores. Esta regulación es mediada por una red de factores de transcripción de fotorreceptores centrada en el factor de transcripción de homodominio Otx, CRX (Hennig y col., 2008). Este grupo de investigación realizó el ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina y RT-PCR en cinco factores de transcripción, el linaje determinante de fotorreceptores CRX, los linajes determinantes de bastones Nrl y Nr2e3, y los factores de determinación de conos Trβ2 y el factor NeuroD1, que han demostrado ser importantes para la supervivencia de los fotorreceptores (Morrow y col., 1999; Pennesi y col., 2003). Sus resultados demostraron que todos los factores de transcripción analizados se unen a su propio promotor así como también a otros reguladores examinados, sugiriendo que cada factor regula su propia expresión (auto-regulación), y regula otros factores actuando en paralelo o corriente abajo (para-regulación), y envían información regulatoria a los promotores de los factores que indujeron corriente arriba (regulación por retroalimentación). El mejor ejemplo lo constituye CRX, el cual directamente se

une a su propio promotor, y auto-activa su propia expresión. Luego, el CRX se une a los promotores de otros factores de transcripción de la retina tales como *Nrl*, *Nr2e3*, *Trf32*, *Rxry*, *Rorb*, and *NeuroD1* y regula su expresión (para-regulación). Además, se ha demostrado que el CRX se puede unir a tres sitios blanco del promotor de rodopsina así como también a sitios blanco de muchos otros genes promotores de los bastones de la retina. El CRX actúa como un activador transcripcional en la expresión de genes reporteros de la rodopsina, actuando de manera sinérgica con otro factor de transcripción fundamental de las células fotorreceptoras de la retina, *Nrl*. Estos resultados sugirieron por primera vez que los altos niveles de expresión de la rodopsina requieren de al menos dos factores de transcripción de fotorreceptores.

Los núcleos de las células están constituidos además por fosfolípidos (FL). Si bien los fosfolípidos en el núcleo representan un bajo porcentaje entre sus constituyentes, es conocido que los mismos cumplen importantes funciones, no solo estructurales, sino también como reservorio de metabolitos lipídicos bioactivos que actúan como segundos mensajeros modulando la actividad de diferentes proteínas.

Los FL se encuentran ampliamente distribuidos en el núcleo, en zonas tales como la membrana nuclear, la matriz nuclear, y asociados a la cromatina (Cocco y col., 1980). Se ha reportado que presentan una composición y recambio diferente a los FL presentes en las membranas plasmática, microsomal y mitocondrial, por lo que se considera que el núcleo celular funciona de manera autónoma con respecto al metabolismo lipídico de los demás compartimientos celulares.

Muchos grupos de investigación han reportado que existen vías de señalización celular dependientes de lípidos a nivel nuclear, que controlan funciones biológicas críticas tales como la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis (Cocco y col., 2001; D'Santos y col., 2000; D'Santos y col., 1998; Martelli y col., 2004).

Se ha demostrado hasta el momento la presencia de una gran variedad de enzimas relacionadas en el metabolismo lipídico, entre las cuales se pueden mencionar: la fosfatidilinositol sintetasa, la fosfatidilinositol 3,4,5-quinasa, la acil-3-glicerofosfato

aciltransferasa, la CDP colina:1,2-diacilglicerol fosfocolina transferasa (CPT), la fosfocolina citidil transferasa (CCT), la diacilglicerol aciltransferasa, la acetiltransferasa, la fosfolipasa C de fosfatidilinositol (PI-PLC), la fosfolipasa C de fosfatidilcolina (PC-PLC), la fosfolipasa A2 (PLA2), la fosfolipasa D (PLD) y la diacilglicerol quinasa (DAGK) (Ledeen y Wu, 2004). Nuestro grupo de investigación ha reportado también, en los núcleos de cerebelo de rata, la presencia de la fosfatidato fosfohidrolasa (PAPasa) y de la diaciglicérido lipasa (DAGL), así como las actividades de la PLA1 y de la PLA2 sobre el PA (Gaveglio y col., 2011).

Asimismo, se ha demostrado que los FL, los esfingolípidos, o los segundos mensajeros generados a partir de ellos modulan las actividades de ciertas proteínas del ciclo celular, a las histonas, a las distintas isoformas de ARN y ADN-polimerasas, a la topoisomerasa I, y a los factores de transcripción que conforman el complejo AP-1 (Tamiya-Koizumi, 2002), regulando así la expresión de genes, y la propia estructura nuclear. Además, se ha descrito la presencia de componentes claves de vías de señalización celular, como son las isoformas de proteína quinasa C (PKC), los canales iónicos, las quinasas activadas por mitógenos, los transportadores de calcio, etc.

La presencia de todos los componentes celulares implicados en el metabolismo lipídico a nivel nuclear sugiere la importancia de los mismos en funciones celulares críticas.

DAG y PA. Su rol como mensajeros lipídicos.

El DAG no solo es un importante producto intermediario en la síntesis de muchas clases de lípidos, es además una molécula bioactiva que actúa como segundo mensajero modulando la actividad de una gran cantidad de enzimas, a las cuales se une a través de los dominios C1 (ricos en cisteína), similares a los de las PKC. El DAG promueve la activación de las isoformas de PKC de clase novel y convencional (Newton, 2009), de las proteínas G pequeñas de tipo Ras a través de proteínas de la

familia de RasGRP (Ron y Kazanietz, 1999) y recluta a compartimientos de membrana proteínas tales como las quimerinas, la proteína quinasa D y la proteína Munc 13, (Ron y Kazanietz, 1999). Además promueve la activación de canales TRPC (canales de potencial de receptor transciente) (Lucas y col., 2003). Es además un potente activador de los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEF), lo cual indica su participación en la regulación de las proteínas G pequeñas (familia de las Rho y las Ras) (Topham y Prescott, 1999). También interviene en otras funciones celulares, como la reorganización del citoesqueleto, el crecimiento celular y la carcinogénesis (Takai y col., 2001).

El DAG puede ser metabolizado a través de cuatro vías: 1) por acción de las diacilglicerol lipasas (DAGL), que hidrolizan las cadenas de ácidos grasos, generando monoacilglicerol y ácido graso, 2) por adición de CDP-colina y CDP-etanolamina para formar fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE) 3) por acilación por parte de las aciltransferasas para formar triglicéridos ó 4) por fosforilación llevada a cabo por las DAGK, para dar ácido fosfatídico (PA).

El ácido fosfatídico, producto de la fosforilación del DAG por las DAGK, es también un importante segundo mensajero lipídico, que ha sido implicado en una gran variedad de respuestas celulares tales como la polimerización de actina, la mitogénesis, el tráfico de membranas y la liberación de hormonas (Cockcroft, 1992; Cockcroft y Thomas, 1992; Dillon y col., 1997; Divecha y col., 2000; Exton, 1994). Se ha reportado que el PA estimula la síntesis de ADN (Knauss y col., 1990) y regula la actividad de varias enzimas claves en la transducción de señales como la PIP5-K, que participa en la resíntesis de los polifosfoinosítidos (Jenkins y col., 1994; Moritz y col., 1992); la PLC γ (Jones y Carpenter, 1993); la proteína quinasa dependiente de p21, PAK1 (Bokoch y col., 1998); la proteína quinasa C atípica (PKC ζ) (Limatola y col., 1994); la proteína activadora de la hidrólisis de GTP, RasGAP (Tsai y col., 1990), la quinasa de serina y treonina implicada en los procesos de crecimiento y proliferación celular (mTOR) (Fang y col., 2001), la esfingosina quinasa 1 (SK) (Delon y col., 2004), el represor

transcripcional, Opi1p (Loewen y col., 2004); la subunidad catalítica de la proteína fosfatasa 1 c gama (PP1 γ) (Jones and Hannun, 2002) y la proteína quinasa Raf-1 (Ghosh y col., 1996).

En los núcleos se ha demostrado que el DAG es un segundo mensajero clave generado por la activación de vías de señalización dependientes de lípidos (Cocco y col., 2001; D'Santos y col., 2000; D'Santos y col., 1998; Martelli y col., 2004). Los datos reportados por distintos laboratorios han demostrado que el DAG nuclear puede provenir de la hidrólisis de los polifosfoinosítidos o de la fosfatidilcolina (D'Santos y col., 1999; Divecha y col., 2000) y como consecuencia existen dos *pools* de DAG. Uno de ellos es altamente poliinsaturado y proviene de la hidrólisis de PI por acción de una PLC específica de PI. El otro *pool* está constituido por DAG altamente disaturado y monoinsaturado, y proviene de varias vías, entre las cuales una de las principales es la hidrólisis de PC.

Se ha demostrado que ambos *pools* de DAG están independientemente regulados en el núcleo (Goto y col., 2008). En las células MEL, la diferenciación a lo largo de la vía eritroide conduce a una disminución de los niveles de DAG de tipo disaturado y monoinsaturado en los núcleos de las células. Por otro lado, durante la progresión del ciclo celular, no se observaron cambios en los niveles de DAG monoinsaturado o disaturado, mientras que se produjo un incremento en los niveles de PA radioactivo altamente poliinsaturado 2 horas después de un bloqueo en la fase G2/M inducido por Nocodazol.

En la retina bovina, nuestro grupo de investigación realizó la determinación de la composición de ácidos grasos del DAG proveniente de las retinas utilizadas para la biosíntesis de DAG-[^3H] y confirmó que existe un importante porcentaje de la especie 18:0-20:4. Estos resultados se suman a lo reportado previamente en vaca, donde el predominio de diacilglicéridos con araquidonato, muy diferente al de los fosfolípidos mayoritarios (PC, PE, PS), fue interpretado como una evidencia de la contribución de reacciones degradativas sobre los fosfoglicéridos conteniendo especies tetraenoicas

(Aveldaño y Bazán, 1974). Esta relación ya había sido sugerida en el cerebro de rata (Keough y col., 1972). La metabolización activa de los fosfoinosítidos en la retina, también evaluada en nuestro grupo de trabajo, y los resultados de composición confirmarían que la principal vía generadora de DAG en la retina es la hidrólisis de polifosfoinosítidos.

Dada la importancia fisiológica del DAG y del PA como segundos mensajeros lipídicos intervinientes en una gran diversidad de procesos celulares y nucleares, y teniendo en cuenta los numerosos resultados que indican la presencia de las vías de señalización responsables de la síntesis y la degradación de estos segundos mensajeros a nivel nuclear, iniciamos nuestros estudios evaluando la actividad de las DAGK en los núcleos de la retina bovina, proyectando los mismos hacia la interpretación de su participación en la función esencial de este tejido, la recepción y transmisión de la luz.

Las Diacilglicerol Quinasas.

Las diacilglicerol quinasas (DAGK) son enzimas claves en el control del contenido de los diacilglicéridos. Catalizan la fosforilación de DAG, para convertirlo en ácido fosfatídico (PA), utilizando ATP como cosustrato de la reacción enzimática.

La multifuncionalidad del precursor (DAG) y de su producto (PA) explica la existencia de numerosas isoformas de DAGK. Cada una de ellas presenta características únicas en cuanto a su expresión, los mecanismos de regulación, la unión a moléculas, y la localización subcelular (Goto y col., 2008).

Hasta el momento se han identificado 10 isoformas en los mamíferos, que son clasificadas en cinco subtipos en función de sus características estructurales (Figura 5). La clase 1 comprende las isoformas α (Sakane y col., 1990; Schaap y col., 1990), β (Goto y Kondo, 1993), y γ (Goto y col., 1994; Kai y col., 1994); la clase 2, las isoformas δ (Sakane y col., 1996), η (Klauck y col., 1996), y κ (Imai y col., 2005); la clase 3, la isoforma ϵ (Tang y col., 1996); la clase IV, las isoformas ζ (Bunting y col., 1996; Goto y

Kondo, 1996) y I (Ding y col., 1998); la clase V, la isoforma θ (Houssa y col., 1997). Además, se han reportado variantes de *splicing* alternativo en muchas de las isoformas DAGK, tales como la DAGK β (Caricasole y col., 2002), $-\gamma$ (Kai y col., 1994), $-\delta$ (Sakane y col., 2002), $-\eta$ (Murakami y col., 2003), $-\iota$ (Ito y col., 2004), y $-\zeta$ (Ding y col., 1998).

Las características comunes en la estructura primaria de todas las isoformas DAGK son: un dominio catalítico altamente conservado y dos o tres dominios ricos en cisteína (CDR) similares a los de la PKC (C1A y C1B).

Las características distintivas de cada subtipo se detallan a continuación:

Las isoformas pertenecientes a la clase I (DAGK α , β y γ), se caracterizan por poseer dominios unidores de calcio (*EF hands*). Cuando el Ca^{2+} se une a los dominios *EF hands*, se produce un aumento de la actividad de dichas isoformas (Yamada y col., 1997).

Las pertenecientes a la clase II (DAGK δ , η y κ), poseen dominios homólogos a la *pleckstrin* (PH), que unen fosfoinosítidos. En el caso de la DAGK δ , los fosfoinosítidos se unen de forma débil y no selectiva a los dominios PH (Takeuchi y col., 1997). Además, las isoformas DAGK δ y DAGK η poseen en el extremo C-terminal un dominio SAM (*sterile alpha motif*), que permite la localización de la DAGK δ en el retículo endoplásmico, en donde participa en el tráfico de vesículas hacia el aparato de Golgi (Nagaya y col., 2002). La DAGK κ , además, posee repeticiones EPAP (Glu-Pro-Ala-Pro) y un dominio PDZ. Los dominios PDZ intervienen en el reclutamiento e interacción de proteínas, con implicancias en la formación de armazones proteicos y redes de señalización.

La DAGK ϵ es la única isoforma perteneciente a la clase III. Presenta dos características peculiares: posee una estructura primaria básica dado que no contiene dominios regulatorios identificables, y tiene preferencia por un sustrato DAG con un grupo araquidonoil en posición 2 (Tang y col., 1996; Walsh y col., 1995). Esta

preferencia sugiere que la DAGK ϵ estaría implicada en la resíntesis de los polifosfoinosítidos que contienen alta proporción de ácido araquidónico (Shulga y col., 2011; Rodríguez de Turco y col., 2001; Topham, 2006; Topham y Prescott, 1999).

Las isoformas de la clase IV (DAGK ζ y ι), tienen una señal de localización nuclear (NLS) ubicada en una región homóloga a los dominios de fosforilación de las proteínas MARKS (*miristoylated alanine-rich C-kinase substrate*) (Ding y col., 1998; Topham y col., 1998); un dominio PDZ (al igual que la isoforma DAGK κ) y cuatro repeticiones de ankirina en la región C-terminal.

La DAGK θ , que pertenece a la clase V, contiene tres dominios CDR (en lugar de dos) y un dominio de asociación a Ras (RA).

Familia de isoformas DAGK

Subtipos

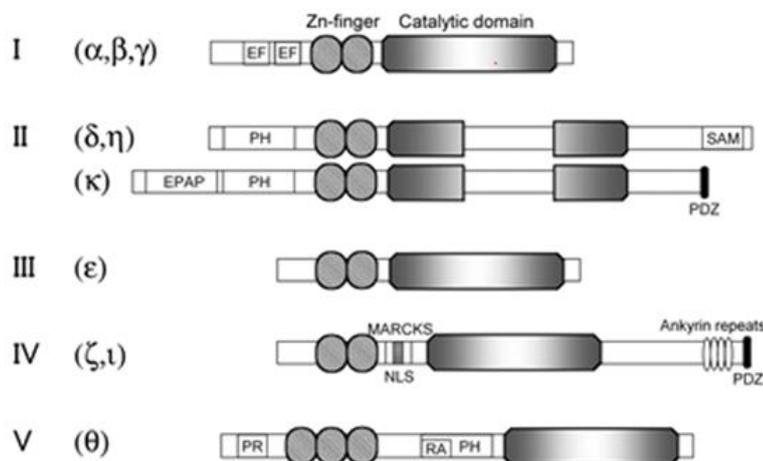


Figura 5. La familia de las isoformas DAGK en los mamíferos.

En cuanto a la distribución subcelular de las distintas isoformas de las DAGK, los estudios demuestran que algunas son citosólicas, otras están asociadas a las membranas y otras se localizan en el núcleo (Goto y col., 2008)

Si bien los resultados de varios grupos de investigación demuestran que la mayoría de las isoformas DAGK, a excepción de la DAGK ζ , se localizan en compartimientos

extranucleares, por ejemplo: DAGK β colocaliza con los filamentos de actina, DAGK γ con el complejo de Golgi y DAGK ϵ con el retículo endoplasmático (Kobayashi y col., 2007), varias isoformas DAGK han sido detectadas en el núcleo de distintos tipos celulares. Se ha observado que las DAGK α y ι translocan al núcleo en respuesta a ciertos estímulos, mientras que una significativa fracción de la DAGK θ se localiza en el núcleo de manera constitutiva (Kobayashi y col., 2007). Por transfección de diferentes isoformas de DAGK en las células COS-7, fueron detectadas en el núcleo las isoformas DAGK β , γ , δ y ϵ , y se ha demostrado que todas ellas tienen importantes implicancias en el control de la progresión del ciclo celular.

La activación de las distintas isoformas de DAGK es compleja y única para cada una de ellas. En la mayoría de los casos, las DAGK pueden translocar a compartimientos de membrana para tener acceso a su sustrato, el DAG. Además, la actividad DAGK puede ser modificada por otros cofactores tales como los lípidos y el calcio. Estas características permiten una regulación célula o tejido-específica, dependiente de la disponibilidad de cofactores y del tipo de estímulo que recibe la célula (Luo y col., 2004).

Respecto a la distribución tisular, las isoformas DAGK han sido detectadas en una gran variedad de tejidos por distintas técnicas bioquímicas. Con excepción de las DAGK ϵ y δ , quienes son muy ubicuas, todas las isoformas descritas hasta el momento han sido halladas preferentemente en el SNC en niveles equivalentes o mayores a los del resto de los tejidos. La diversidad molecular y los patrones de expresión diferencial de las isoformas DAGK en el cerebro, sugieren una importancia fisiológica de estas enzimas a nivel cerebral (Goto and Kondo, 1999). Se han observado altos niveles de expresión en el hipocampo, el bulbo olfatorio y la retina (Topham y Prescott, 1999).

Aunque hasta el año 2012 la DAGK γ había sido la única isoforma detectada en bastones activados por la luz (Huang y col., 2000), nuestro grupo de investigación ha

reportado recientemente la presencia de DAGK ϵ en las células fotorreceptoras de la retina de bovinos y rata. Asimismo, hemos hallado que el estímulo lumínico produce cambios en la localización de esta isoforma en las distintas zonas de las células fotorreceptoras (Natalini y col., 2013)

Por otro lado y tal como introdujéramos previamente, los estudios de inmunohistoquímica de nuestro laboratorio revelaron que la DAGK ϵ se localiza en diferentes capas de la retina de rata en respuesta a la luz. La capa nuclear externa, constituida por los núcleos de las células fotorreceptoras, es una de las capas en las que se observa inmunotinción que se modifica en función de la luz. Este hallazgo sentó las bases para el análisis de la presencia y la actividad de esta y otras isoformas DAGK en los núcleos de la retina bovina, y el análisis de los efectos de la luz sobre la actividad y la distribución de las DAGK en los núcleos de las células fotorreceptoras de la retina bovina.

Enzimas relacionadas con la generación del DAG y con sus efectos modulatorios. Las fosfolipasas C (PLC) y las proteínas quinasas C (PKC).

Muchas hormonas, factores de crecimiento y otros estímulos inducen incrementos en los niveles de DAG a través de la hidrólisis de los fosfoinosítidos por las PLC. La vía clásica más extensamente estudiada de generación de DAG ha sido la vía que involucra a una PLC específica para fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP₂-PLC). La hidrólisis de PIP₂ por parte de la PIP₂-PLC produce un incremento rápido, pero transitorio, de los niveles de DAG e inositol trifosfato (IP₃). El IP₃ induce la liberación de Ca²⁺ desde reservorios intracelulares y junto con el DAG, capacitan a las PKC dependientes de Ca²⁺ y DAG para su translocación a la membrana plasmática y su

posterior activación. Debido a esto, las PLC actúan como moduladores fundamentales del balance de los fosfoinosítidos.

Hasta el momento han sido identificadas trece isoformas de PLC, las cuales han sido subdivididas dentro de seis clases: β (1-4), γ (1, 2), δ (1, 3, 4), ϵ , ζ , y η (1, 2), en función de su estructura y los mecanismos de activación regulatorios (Fukami y col., 2010).

La PLC β 1 fue la primera isoforma de PLC identificada en el núcleo (Divecha y col., 1993; Martelli y col., 1992). Posteriormente, otras isoformas de PLC han sido localizadas en el núcleo, incluyendo la β 2 (Bertagnolo y col., 1997), β 3 (Faenza y col., 2004), γ 1 (Bertagnolo y col., 1998), δ 1 (Yamaga y col., 1999), δ 4 (Liu y col., 1996), y ζ (Cooney y col., 2010; Sone y col., 2005). El rol de estas isoformas de PLC en el núcleo ha sido extensamente estudiado y se consideran cofactores clave para numerosos procesos celulares, tales como el crecimiento celular, la proliferación y la diferenciación. Las mismas cumplen diferentes roles dependiendo del tipo celular. En el caso de la PI-PLC β 1, los estudios en las células de eritroleucemia murina demostraron que la misma está involucrada en la regulación de las fases G1/S y G2/M del ciclo celular, mientras que ha sido implicada en el proceso de diferenciación en las células hematopoyéticas del musculo esquelético y de los adipocitos. La señalización inducida por la PI-PLC β 2 nuclear constituye un sistema de señalización independiente de su contrapartida en la membrana plasmática (Piazzi y col., 2013).

Hasta el momento, se han identificado varias proteínas blanco que se encuentran físicamente asociadas a las PIP₂-PLC nucleares. En las células MEL fue reportado que la ciclina D3 (Faenza y col., 2000), el factor de transcripción p45/NF-E2 (Faenza, I. y col., 2002), el antígeno CD24 (involucrado en diferenciación u hematopoyesis) (Fiume y col., 2005), el factor de *splicing* Sfr3 (Bavelloni y col., 2006) y la lamina B1 (Fiume y col., 2009) son afectadas por la PI-PLC β 1 nuclear. Además, los experimentos de coimmunoprecipitación demostraron que la Srp20 y la lamina B1 se hayan asociadas con la PI- PLC β 1.

La retina presenta un metabolismo de fosfoinosítidos muy activo, y se ha comprobado la presencia de ciertas isoformas de PLC. Diversos estudios han demostrado que la luz produce la activación de algunas isoformas de PIP₂-PLC, lo cual conduce a la hidrólisis de PIP₂ y a la estimulación de la PKC. En la retina bovina se demostró la presencia de PLCβ1, PLCγ1 Y PLCδ1 por inmunocitoquímica. La inmunoreacción de la PLCγ1 en la capa de las células fotorreceptoras fue dependiente del estado de adaptación a la luz-oscuridad de las retinas, y tanto la actividad como el contenido de la PLCγ1 fueron mayores en los segmentos externos de las células fotorreceptoras de retinas expuestas a la luz con respecto a las retinas mantenidas en oscuridad (Ghalayini y col., 1998).

La PLCβ4 también fue hallada en la retina y en el cerebro (Lee y col., 1993). Resultados de inmunohistoquímica demostraron que esta isoforma se localiza en las células fotorreceptoras, en las células bipolares, en las células horizontales y en las células ganglionares de la retina bovina (Ferreira y Pak, 1994). Además, se ha demostrado que cumple importantes funciones en el proceso visual (Jiang y col., 1996).

El DAG, producto de la PIP₂-PLC, es un potente activador de algunas isoformas de PKC y se ha hipotetizado que el DAG nuclear podría también estar involucrado en la señalización de PKC (Divecha y col., 1991).

Las PKC son una familia de serina/treonina quinasas que regulan diversas funciones celulares, tales como el crecimiento, la diferenciación, la apoptosis y la reorganización del citoesqueleto (Black, 2000; Dempsey y col., 2000; Nishizuka, 1995). La familia de las PKC de mamíferos comprende diez isoformas, que presentan como característica común el requerimiento de fosfolípidos para llevar a cabo su actividad, pero difieren en su estructura y la dependencia de otros activadores. A raíz de estas diferencias, se subdividen en tres grupos: convencionales; nóveles y atípicas (Newton, 1997). Entre las PKC de tipo convencional, se pueden mencionar a la PKCα, la PKCβ y la PKCγ. La familia de las PKC de tipo novel está constituida por las isoformas PKCδ, -ε, -η, y -θ; y

las PKC de tipo atípicas son la PKC ζ y la PKC ι . Mientras que las PKC convencionales presentan dominios en su estructura que las hacen sensibles al DAG y al Ca²⁺, las PKC de tipo novel no son sensibles al Ca²⁺, pero son 2 veces más sensibles al DAG, con respecto a las anteriores. Las PKC atípicas no son reguladas por Ca²⁺, ni unen DAG, en su caso son las interacciones con proteínas las que controlan la funcionalidad de estas isoformas en la célula (Newton, 2010).

Respecto a su distribución subcelular, las PKC residen en el citoplasma en una conformación inactiva, y son capaces de translocar a la membrana plasmática o a las organelas citoplasmáticas en respuesta a diferentes estímulos (Newton, 2009). Esta respuesta requiere de un estado denominado “maduro” que implica la fosforilación de distintos residuos aminoacídicos de la proteína. En esta condición, la proteína esta capacitada para ser activada por los respectivos moduladores.

Un gran cuerpo de evidencia sostiene que las PKC cumplen importantes roles a nivel nuclear, sugiriendo que podrían ser parte de una vía de señalización que comunica a la membrana plasmática con el núcleo (Buchner, 1995; Olson y col., 1993). Además, se ha reportado que todas las isoformas de PKC están presentes en el núcleo celular en algunos sistemas celulares bajo ciertas condiciones, como consecuencia de su translocación desde el citoplasma, o como enzimas residentes del núcleo.

Las PKC están involucradas en procesos fisiológicos y patofisiológicos de la retina y cumplen importantes roles en la transducción de señales (Shin y col., 2006).

Estudios de WB mostraron que varias isoformas de PKC, incluyendo las PKC α , β 1, δ y θ fueron detectadas en la retina bovina (Shin y col., 2006). Otros resultados revelaron que dos isoformas de PKC, la PKC β 1 y la PKC γ , son fundamentales para el desarrollo de los bastones de la retina. Su ausencia inhibe completamente la diferenciación de este tipo celular (Pinzon-Guzman y col., 2011).

Existen evidencias que demuestran que ocurren interacciones directas entre las distintas isoformas de la familia de las DAGK, las PLC y las PKC, todas ellas íntimamente involucradas con el metabolismo del DAG.

Hasta la fecha, ha sido reportada la interacción entre la DAGK γ y la PKC γ o la PKC α (Yahagi y col., 2005). Además, se ha demostrado que la PKC ϵ es capaz de unirse y fosforilar a la DAGK θ , contribuyendo a la translocación a membrana de la DAGK θ (van Baal J. y col., 2005). La fosforilación de la DAGK δ dependiente de PKC, en los residuos de serina del dominio homólogo a la *pleckstrin*, regula negativamente su translocación a la membrana. (Imai y col., 2004).

Las interacciones directas entre las PKC y las DAGK, que conducen a la fosforilación de estas últimas, resultan ser un mecanismo común que regula su localización contribuyendo a la regulación específica de las DAGK.

Por otro lado, se ha demostrado que la isoforma nuclear mejor caracterizada, la DAGK ζ , que reside en los *speckles* nucleares, interactúa físicamente con la PLC β 1 (Evangelisti y col., 2006).

En las células 3T3 de fibroblastos se demostró que en respuesta al estímulo con IGF-1, la PKC α , sensible a DAG, migra hacia el núcleo (Neri y col., 1994) e interviene en un proceso de retroalimentación negativo para terminar la activación de la PLC β 1 nuclear inducida por IGF-I (Xu y col., 2001). Además, la PKC α fosforila a la PLC β 1 en el residuo serina 887 y esto produce una disminución de la actividad de la PLC β 1. Un trabajo publicado por Scarlata y colaboradores también reportó que la fosforilación de PI-PLC por PKC regula su distribución subcelular. Esta fosforilación le permite a la PI-PLC mantenerse localizada dentro del núcleo (Piazzi y col., 2013).

En la retina se demostró que la activación de la PLC y la PKC induce el inicio de la translocación de la arrestina hacia los segmentos externos, lo cual sustenta la hipótesis de que la translocación de arrestina está asociada con la vía de los fosfoinosítidos (Orisme y col., 2010).

De las interacciones antes mencionadas, y de las importantes funciones que cumplen todas ellas en la retina de los vertebrados y en los núcleos de las células de distintos

tejidos del organismo, se deduce la importancia del análisis de la presencia, localización y regulación de estas enzimas en nuestro modelo en estudio.

Capítulo II: Efectos de la insulina en los núcleos de la células fotorreceptoras de la retina bovina.

La insulina y el receptor de insulina.

La insulina es una hormona polipeptídica constituida por 51 aminoácidos, que presenta un peso molecular de 5734 kDa. Es producida y secretada por las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas. Está íntimamente ligada al metabolismo de los carbohidratos, dado que cumple la función de regular la concentración plasmática de glucosa.

Los efectos de la insulina son mediados por su unión al receptor de insulina (RI). El RI pertenece a la gran familia de receptores con actividad tirosina quinasa. Es una proteína heterotrimérica de membrana constituida por 4 subunidades, dos subunidades alfa y dos subunidades beta ($\alpha_2\beta_2$), estabilizadas por puentes disulfuro. La subunidad α es extracelular y tiene el dominio de unión al ligando, mientras que la subunidad β está anclada a la membrana plasmática por un dominio transmembrana y tiene un dominio citoplasmático donde reside la actividad tirosina quinasa (Ullrich y col., 1985; Ullrich y col., 1986). La unión de la insulina a dos sitios asimétricos de las subunidades extracelulares α produce cambios conformacionales que conducen a la autofosforilación de las subunidades β del receptor, estimulándose la actividad tirosina quinasa intrínseca del mismo sobre sustratos intracelulares como los Shc o los IRS (sustratos del receptor de insulina) y la posterior activación de moléculas de señalización intracelular.

Históricamente la insulina ha sido asociada con el metabolismo de los carbohidratos, pero es también bien reconocido su rol en el metabolismo de los lípidos y las proteínas. Los principales blancos periféricos de la insulina son el hígado, el músculo, y el tejido adiposo. La señalización de insulina en el sistema nervioso ha recibido menos atención, siendo éste considerado durante muchos años un órgano insensible

a la insulina. Este punto de vista cambió cuando se descubrió que el receptor de insulina estaba ampliamente distribuido en el cerebro, con una marcada variación en su densidad de acuerdo a la zona. Estas observaciones formaron las bases para la rápida expansión del campo de investigación basado en la elucidación de los posibles roles de la insulina en el cerebro, y las implicancias de la hormona en procesos tales como la cognición y la plasticidad sináptica, entre otros.

El RI cerebral presenta diferencias estructurales y funcionales con respecto al clásico RI ubicado en los órganos periféricos. Está involucrado en procesos específicos para cada región, y por activación de mecanismos diferentes a aquellos activados en el metabolismo de la glucosa.

Existen dos isoformas del RI, designadas como A y B. Se diferencian en doce aminoácidos codificados por el exón 11, los cuales están presentes en la isoforma B pero no en la A que, en consecuencia, es más pequeña. El origen de esa diferencia que es post-traducciona, deriva de un proceso de *splicing* alternativo del ARNm en el exón indicado. Se considera que el tipo A es una variedad propiamente fetal. En el SNC están presentes las dos isoformas del receptor. Ambas isoformas tienen un peso molecular inferior al de los receptores de los tejidos periféricos debido a que el grado de glicosilación de sus subunidades α y β es menor (Chiu y Cline, 2010).

En el cerebro y las neuronas periféricas, como las de la retina, se expresa predominantemente el RI de tipo A, que presenta mayor afinidad por la insulina comparado con el RI de tipo B. Las dos isoformas tienen distintas afinidades por la insulina y las distintas isoformas de IGF. Mientras la B posee elevada afinidad por la hormona y solamente es capaz de unirse al IGF-2 cuando éste se encuentra en concentraciones suprafisiológicas, el receptor de tipo A se une a la insulina y al IGF-2 con afinidades similares, pero no se une al IGF-1 a concentraciones fisiológicas de éste. La capacidad de los receptores de insulina neuronales de interactuar con varios ligandos sugiere que los mismos cumplen funciones versátiles en el SNC (Chiu y Cline, 2010).

Vías de señalización activadas por la insulina.

Cuando se produce la unión del RI a su ligando se genera un cambio conformacional en la subunidad β del mismo, lo que activa su capacidad tirosina quinasa intrínseca, conduciendo a la autofosforilación del receptor y a la activación de distintas cascadas de señalización. Las dos principales vías de señalización activadas como resultado de la unión de la insulina a su receptor son: la vía de la PI3K/Akt y la vía que involucra a Ras/Raf-1 y a las quinasas ERK1 y ERK2, ERK1/2 (Figura 6).

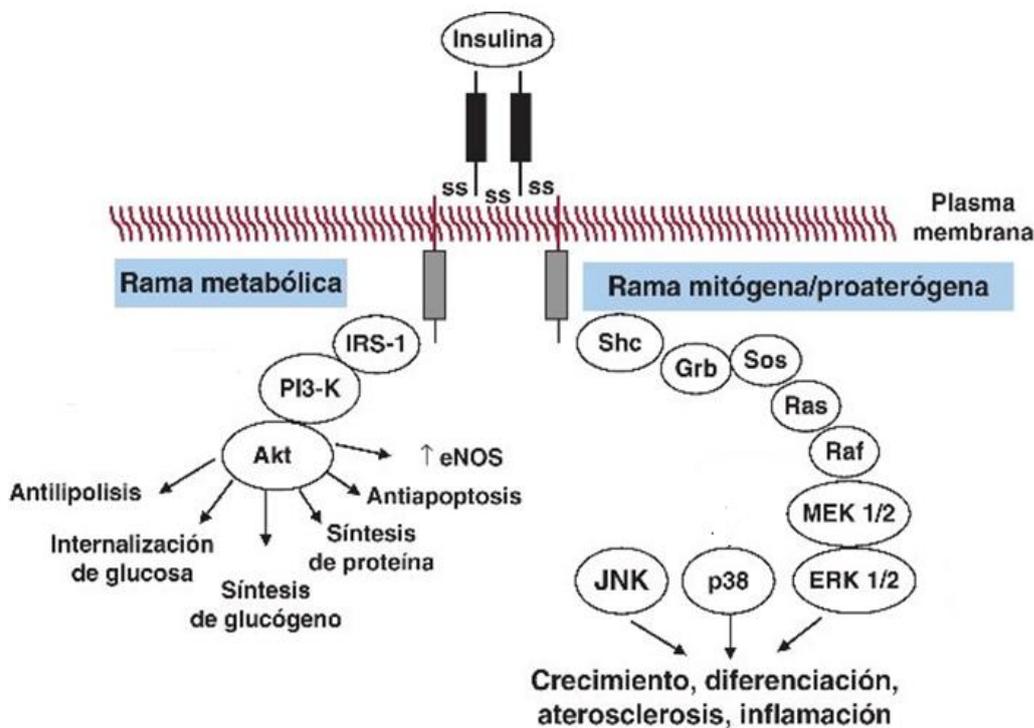


Figura 6. Vías de señalización activadas por la unión de la insulina a su receptor.

La cascada de señalización de PI3K/Akt se inicia con la unión de la subunidad p85 del dominio SH2 de la PI3K al residuo de tirosina fosforilado del IRS activo, lo cual conduce a la activación de la PI3K, a su translocación a la membrana plasmática y a la subsecuente formación de PI-3,4,5-trifosfato y PI-3,4-bifosfato. Luego, estas moléculas se unen y reclutan proteínas de señalización corriente abajo que contienen dominios homólogos a la *pleckstrin* (PH). Entre ellos, se puede mencionar a la serina/treonina

quinasa Akt, también denominada PKB, la cual es fosforilada por la proteína quinasa dependiente de PI3K, PDK. Mientras que la PDK1 fosforila una serina 408, la PDK2 lo hace sobre la serina 473 de Akt. Una vez fosforilada, Akt transloca a la membrana plasmática donde es activada por el PIP_3 , y en su estado activo ocurre una nueva translocación desde la membrana plasmática hacia el citosol y el núcleo (van der Heide y col., 2006) donde fosforila a proteínas blanco en sus residuos de serina y treonina (Erol, 2008).

Estas proteínas blanco incluyen a la proteína proapoptica Bad, que es inactivada por una fosforilación en el residuo de serina 136, a la caspasa-9, inhibida por una fosforilación en el residuo de serina 196, y a la GSK-3 (Erol, 2008). Los miembros de la familia de factores de transcripción FoxO, presentes en las neuronas, poseen motivos de unión a Akt/PKB y son un blanco de control del crecimiento y la supervivencia neuronal (Jacobs y col., 2003). Ha sido recientemente descrito en células musculares que la acción de IGF-1 a través de la activación de PI3K/Akt regula el contenido de FoxO nuclear. Mientras que el estado fosforilado de Akt excluye a FoxO del núcleo, la inhibición de la vía de la PI3K aumenta los niveles de FoxO nuclear (Schachter y col., 2012).

Una proteína clave en esta vía de señalización es la GSK-3, que se inactiva debido a una fosforilación en un residuo de serina 9 N-terminal mediada por Akt, e inicia múltiples efectos fisiológicos (Srinivasan y col., 2005; Yokoo y col., 2005). Dependiendo de su contexto celular, la GSK-3 β puede ser dirigida a diferentes compartimientos intracelulares (citosol, mitocondria o núcleo) para acceder fácilmente a sus sustratos. La inhibición de la GSK-3 β debida a una inhibición previa de la PI3K ha sido asociada a la prevención de la apoptosis, mientras que su sobreexpresión en algunos tipos celulares resulta en muerte celular. Akt también induce la fosforilación del factor nuclear κB (NF- κB), provocando su translocación al núcleo y una regulación transcripcional. Otro blanco de la vía PI3K/Akt activada por la insulina es CREB, el cual es un componente clave en los procesos de proliferación, crecimiento y

supervivencia en varios tipos celulares. La fosforilación en el residuo de serina 133 de CREB es necesaria para la activación transcripcional de genes antiapoptóticos (Han y col., 2013; Naqvi y col., 2014; Johannessen y col., 2007). En el núcleo, CREB activado puede unirse a promotores que contienen una secuencia consenso para incrementar la transcripción de diversas proteínas de supervivencia, incluyendo Bcl-2 (Liu y col., 2012; Shankar y col., 2010).

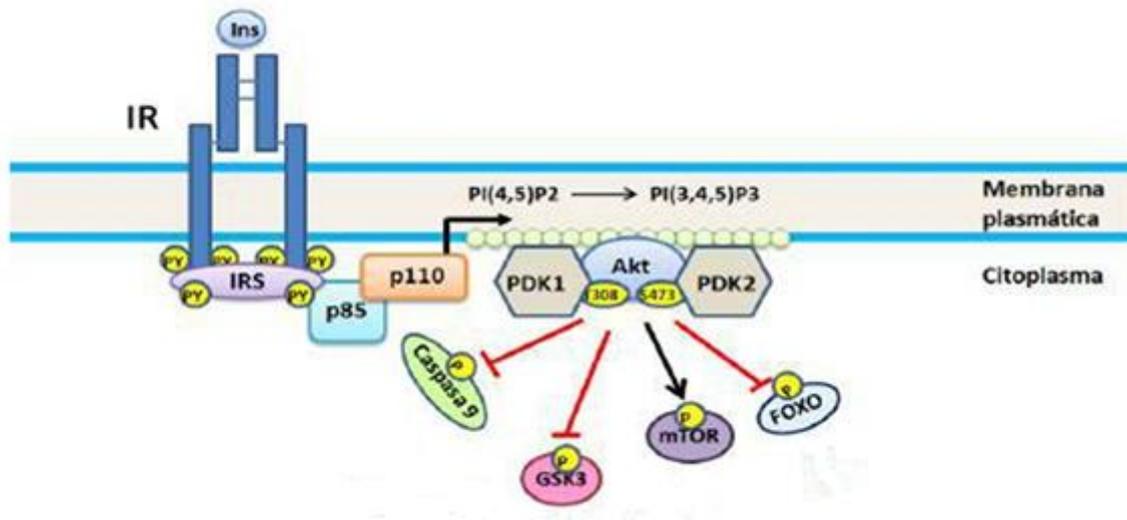


Figura 7. Esquema representativo de los principales componentes de la cascada de señalización de PI3K-Akt activada por la insulina.

La señalización a través de ERK1/2 constituye una vía paralela a la de la PI3K. Tras la fosforilación del RI, la proteína adaptadora SHC se une al RI y Grb2 se une a SHC mediante su dominio SH2, activando la vía de señalización de ERK1/2. Grb2 además interactúa con el intercambiador del nucleótido de guanina (SOS) a través de sus dominios SH3, estimulando el intercambio de GDP (guanosina difosfato) por GTP (guanosina trifosfato) en Ras, lo que la convierte en activa. La activación de Ras produce el reclutamiento de la serina/treonina quinasa Raf, la cual induce la activación de MEK (proteína quinasa quinasa activada por mitógeno). Esta última fosforila (y activa) a ERK1/2, culminado en la activación de numerosos factores de transcripción que controlan la expresión de genes (van der Heide y col., 2006).

La activación de ERK1/2 fue originalmente asociada a un rol antiapoptótico en las neuronas vía fosforilación del residuo serina 112 de Bad (Hetman y col., 1999; Johnson-Farley y col., 2006). Sin embargo, otros autores han demostrado que la ERK1/2 activada está involucrada en procesos tales como la plasticidad sináptica y la muerte celular (Sweatt, 2001; Sweatt, 2004).

Tradicionalmente, la vía de señalización activada por la insulina dependiente de PI3K ha sido considerada una vía funcionalmente separada de aquellas señales dependientes de ERK o MAPK, considerando a la vía de la PI3K como la vía encargada del control del metabolismo, mientras que a la vía que involucra ERK1/2 se la relaciona con los roles mitogénicos (Groop y col., 2005). Sin embargo, varios autores proponen que puede ocurrir una interrelación entre ambas vías de señalización, siendo Raf el posible conector entre ellas.

La insulina y el receptor de insulina en la retina de los vertebrados.

Desde hace más de tres décadas es conocido que el RI y las proteínas de señalización de la insulina están ampliamente distribuidos en el SNC. J Havrankova y colaboradores, en el año 1978, determinaron que la concentración de insulina en el sistema nervioso central de la rata es considerablemente mayor que su respectiva concentración plasmática. Más adelante, otros grupos de investigación observaron que la desregulación de la señalización de la insulina en el SNC está sumamente relacionada con la patogénesis de desórdenes neurodegenerativos tales como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson (Frolich y col., 1998; Takahashi y col., 1996). Estos resultados dieron lugar a una extensa investigación acerca de los efectos de la insulina en el SNC. Sin embargo, la acción de la insulina en la retina ha recibido poca atención.

El RI se expresa en todas las capas de la retina y es homólogo al RI cerebral, pues presenta menores niveles de glicosilación en su subunidad α comparado con en RI del

hígado (Reiter y col., 2003). Además, se ha demostrado que la retina expresa varias de las proteínas asociadas a la vía de señalización de la insulina (Folli y col., 1996). En la retina de rata fue determinada la presencia del sustrato del receptor de insulina 1 (IRS-1) y de la PI3K (Folli y col., 1996). Los autores observaron que el IRS-1 se localiza principalmente en la capa de células ganglionares, pero también se observa inmunotinción en la capa nuclear interna de las células bipolares y amacrinas. Otros grupos de investigación demostraron que el IRS-1 además se expresa en los segmentos externos de los bastones (Gosbell y col., 2000). Por su parte, Diaz y colaboradores demostraron que después de un tratamiento por 24 hs con concentraciones suprafisiológicas de insulina se incrementan los niveles de Akt y ERK1/2 fosforiladas (Diaz y col., 2000).

Por otro lado, se ha reportado que la señalización del RI provee una señal trófica para las neuronas transformadas de retina en cultivo y que la activación del RI rescata a las neuronas de la retina de la apoptosis a través de la activación de la vía PI3K-Akt (Barber y col., 2001). Rajala y colaboradores, quienes demostraron la activación del RI y de la vía de señalización de PI3K/Akt por luz (Rajala y col., 2002), reportaron además que la delección condicional del RI en ratones, que resulta en una expresión reducida del mismo en los bastones retinianos, disminuye significativamente las funciones de la retina y causa la muerte de estos fotorreceptores en ratones expuestos a estrés (Rajala y col., 2008). Estos resultados indicaron que la expresión reducida del RI en los bastones incrementa su susceptibilidad a la degeneración inducida por la luz. Asimismo, sugirieron que las vías de señalización activadas por la unión de la insulina a su receptor son fundamentales para la supervivencia de los bastones y que la activación del RI puede ser una herramienta esencial para la neuroprotección de los bastones de la retina. Más adelante, este grupo de investigación determinó que la delección condicional de la subunidad reguladora p85 de la PI3K en los conos resulta en una degeneración de los mismos relacionada con la edad (Ivanovic y col., 2011). Estos hallazgos sugirieron que la vía de la PI3K es también esencial para la

supervivencia de los conos. Las enfermedades degenerativas de la retina tales como la degeneración macular relacionada con la edad, la retinopatía diabética y la retinitis pigmentosa son enfermedades que resultan en la muerte de las células fotorreceptoras, y que conducen finalmente a la ceguera parcial o total. Colectivamente, todos los resultados antes mencionados sugirieron que la activación de la vía de señalización que involucra el RI/PI3K/Akt cumple importantes roles neuroprotectores en la retina de los mamíferos, y podría tener relevancia clínica (Rajala y col., 2013).

La insulina y el receptor de insulina en el núcleo.

Si bien la insulina ejerce la mayoría de sus efectos celulares reconocidos por su unión al RI ubicado en la membrana plasmática, las evidencias reunidas durante el estudio de los receptores tirosina quinasa (RTK) sugieren que el RI podría translocarse al núcleo, ya que es una característica común de esta clase de receptores. Un importante número de RTK han sido hallados en el núcleo, incluyendo los que unen a las citoquinas, al factor de crecimiento epidermal (EGF), al factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y al factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). El receptor de EGF fosforilado ha sido encontrado en el núcleo de la célula luego de 1-2 min de la estimulación con EGF y alcanzó niveles máximos a los 15 min del estímulo (Lin y col., 2001). El receptor del HGF fue hallado en el núcleo celular en su estado fosforilado, luego de que las células se expusieran al HGF durante un tiempo similar. Su presencia en el núcleo se ha relacionado con la formación de IP_3 y el inicio de señales mediadas por el Ca^{2+} dentro de esta organela (Gomes y col., 2008). La translocación del receptor de FGF al núcleo se produce en una escala de tiempo más larga, alcanzando los niveles máximos a las 3-4 hs del estímulo (Reilly y Maher, 2001). Estos estudios han demostrado que los RTK pueden translocar al núcleo en varias líneas celulares.

Asimismo, fue demostrado que el RI es capaz de translocar al núcleo para iniciar señales mediadas por IP_3 con la participación del calcio, en los cultivos primarios de hepatocitos de rata (Rodrigues y col., 2008). Además, el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina de tipo 1 (IGF-IR) y el RI fueron hallados en el área nuclear y perinuclear en las células de cáncer de mama MCF7. Fue observado que el IGF-IR actúa como activador transcripcional de su propio promotor mientras que el RI nuclear actúa como regulador negativo de la actividad promotora del IGF-IR (Sarfstein y col., 2012). Por otra parte, fue demostrado que el IGF-1R se localiza en el núcleo de las células epiteliales de la córnea en proliferación, y que la localización de dicho receptor parece ser independiente de su ligando (Robertson y col., 2012).

Acciones de la insulina sobre la actividad de las enzimas ligadas a la generación de mensajeros lipídicos.

Si bien las vías de señalización activadas por la insulina más reconocidas son las vías que involucran a componentes celulares tales como PI3K-Akt y las MAPK, existe un gran número de evidencias que demuestran que la insulina es capaz de tener efectos sobre vías de señalización lipídicas involucradas en el metabolismo del DAG.

La influencia de la insulina sobre la composición lipídica de las membranas, su fluidez y algunas actividades enzimáticas ha sido reportada en las membranas de hígado (Petkova y col., 1990). También se ha reportado en hepatocitos aislados de hígado que la insulina induce oscilaciones en los niveles de calcio a nivel nuclear y que estas señales de calcio dependen de la activación de PLC e IP_3 , pero no de los niveles de calcio extracelulares (Rodrigues y col., 2008).

Por otro lado, nuestro grupo de investigación ha reportado que la insulina ejerce importantes efectos sobre las enzimas involucradas con la síntesis de los fosfolípidos en los terminales sinápticos del SNC. Sus resultados demostraron que la insulina modula el metabolismo del DAG y del PA en los sinaptosomas de la corteza cerebral

de ratas adultas y seniles. En el caso de los animales adultos, fue determinado que la misma estimula la síntesis del PA a través de la DAGK por dos mecanismos: la fosforilación del DAG generado por las vías PIP₂-PLC y PLD-PAP2 (acción indirecta) y la activación de la DAGK, independientemente de la generación del DAG de la membrana (acción directa) (Zulian y col., 2006), mientras que en los sinaptosomas de la corteza cerebral de ratas seniles observaron un aumento de la actividad de la vía PLD/PAPasa y una disminución de la actividad de la DAGK (Salvador y col., 2005; Zulian y col., 2006)

Resultados de nuestro laboratorio revelaron, además, que la insulina ejerce un efecto diferencial sobre la producción del MAG y de los productos solubles en agua (PSA) en los sinaptosomas de la corteza cerebral de rata. Esta estimula la producción de MAG y PSA en los animales adultos e inhibe dicha producción en el caso de los animales de edad avanzada.

Esto significa que la insulina ejerce una modulación diferente del metabolismo del DAG y el MAG en los sinaptosomas de las ratas adultas con respecto a las ratas seniles, promoviendo una mayor o menor disponibilidad de estas moléculas de señalización.

En los terminales sinápticos de la CC y el hipocampo de animales seniles, la insulina “recupera” la eficiencia de síntesis de un PA rico en 18:0-20:4 y activa la formación de los fosfoinosítidos (Zulian y col., 2011). Estos estudios permitieron sugerir que esta acción podría explicar parcialmente el rol neuroprotector de la hormona.

Tal como hemos indicado previamente, se ha sugerido que en la retina de los mamíferos la activación de los receptores de tipo RTK por unión de sus ligandos (la insulina ó el IGF-1), participaría en procesos relacionados con la neuroprotección de las células (Rajala y col., 2013).

Hasta el momento, no existen en la bibliografía datos que reporten los efectos de la insulina sobre las enzimas relacionadas con el metabolismo del DAG en los núcleos de la retina bovina. Nuestro trabajo de tesis se orientó a evaluar entonces la

participación de la DAGK nuclear en la señalización de la insulina, aspecto que consideramos relevante para la interpretación de los efectos de la hormona en este tejido.

OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis doctoral fue analizar la presencia de distintas isoformas de DAGK y sus actividades en los núcleos de las células fotorreceptoras de la retina bovina así como la influencia de diferentes estímulos, tales como la luz, el estímulo natural de la retina, y la insulina, una hormona que actúa como factor protector a nivel de SNC y de la retina, sobre la localización subcelular y la actividad enzimática de las DAGK.

Los resultados son descriptos en dos capítulos:

CAPÍTULO I: “Estudio de las DAGK en los núcleos de la retina bovina. Efectos de la luz sobre vías de señalización lipídicas en los núcleos de las células fotorreceptoras”. El propósito de las investigaciones descritas en el capítulo I de esta tesis doctoral fue evaluar si la estimulación lumínica, que dispara el proceso de la fototransducción e inicia en los segmentos externos de las células fotorreceptoras otras vías de señalización asociadas, produce cambios en la actividad DAGK a nivel nuclear en las células fotorreceptoras de la retina bovina.

Sus objetivos específicos son:

1. Determinar la presencia y actividad de las DAGK en los núcleos de la retina bovina.
2. Demostrar la presencia de las DAGK en los núcleos de las células fotorreceptoras de la retina bovina, caracterizar esta vía de generación de PA y determinar sus parámetros cinéticos.
3. Estudiar la localización subcelular y la actividad enzimática de distintas isoformas DAGK en los núcleos de las células fotorreceptoras y los efectos de la luz sobre las mismas.
4. Identificar, mediante el uso de inhibidores, las vías enzimáticas generadoras del sustrato de las DAGK, el DAG.
5. Estudiar la regulación de las DAGK sobre la PKC α , enzima activada por el DAG, y analizar los efectos de la luz sobre ella.

CAPÍTULO II. “Activación de las vías de señalización de insulina y sus efectos a nivel nuclear en las condiciones de luz y oscuridad”.

El propósito de las investigaciones descritas en este capítulo fue determinar si los efectos desencadenados por la luz en los núcleos de las células fotorreceptoras están relacionados con una eventual activación del receptor de insulina y de las vías de señalización relacionadas, y analizar si la insulina genera efectos sobre la actividad DAGK nuclear y las vías de señalización tradicionalmente activadas por esta hormona.

Los objetivos específicos son:

1. Analizar la presencia de los componentes de las principales vías de señalización activadas por la insulina en los núcleos de las células fotorreceptoras de la retina, así como los efectos de la luz sobre los mismos.
2. Determinar los efectos directos e indirectos de la insulina sobre la actividad DAGK nuclear en las células fotorreceptoras de la retina bovina.
3. Evaluar la presencia del receptor de insulina a nivel nuclear, en la fracción de los núcleos de los fotorreceptores.
4. Evaluar si la luz y/o la insulina modulan el contenido del receptor de insulina nuclear.
5. Analizar los efectos de la insulina sobre la vía de las MAPK a nivel nuclear.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES.

El aislamiento y la purificación de las fracciones subcelulares, así como los ensayos enzimáticos utilizados en este trabajo de tesis requirieron la preparación de diferentes soluciones tampón. Los reactivos utilizados para realizar dichas soluciones (Hepes, Tris, EDTA, CaCl₂, NaCl, KCl, sacarosa) se adquirieron en Sigma Aldrich Co. Los inhibidores de proteasas (PMSF, aprotinina, leupeptina, pepstatina), el protector de sulfhidrilos libres (DTT), la DOPS, la insulina y otros reactivos utilizados en esta tesis doctoral también fueron adquiridos en Sigma Aldrich Co. Los solventes empleados fueron de los laboratorios Merck, Dorwill S. A., J.T.Baker y U.V.E. Las sílicas gel G y H utilizadas para la realización de las placas cromatográficas para TLC fueron adquiridas en Merck Laboratories. Otros reactivos y solventes fueron de Merck, Mallinckrodt y Riedel de Haën. Los sustratos radioactivos tales como el ATP-[γ -³²P] (3.000 Ci/mmol) y el glicerol-[2-³H] (16 Ci/mmol) fueron adquiridos a través de representantes locales en Perkin Elmer Inc, USA. El reactivo para preparar la solución de centelleo líquido, premezcla de PPO y bis-MSB (98: 2), fue adquirido en Research Products International Corp, USA. El 1,2-dioleoilglicerol (DOG) y el 1-estearoil, 2-araquidonoilglicerol (SAG) utilizados como sustratos en los ensayos de actividad enzimática DAGK, así como los inhibidores y activadores enzimáticos U73122, R59022, LY y PMA fueron generosamente obsequiados por el Dr. Nicolás Bazán (Neuroscience Center of Excellence at Louisiana State University Health Sciences Center, New Orleans, USA) . Los anticuerpos primarios anti-DAGK utilizados en las técnicas de *western Blot* e inmunofluorescencia fueron provistos gentilmente por el Dr. Matthew Topham (Huntsman Cancer Institute, University of Utah, USA), y el Dr. Nicolás Bazán. Los anticuerpos primarios policlonales de conejo anti-fosfo-PKC α / β II (Thr638/641) (#9375), anti-fosfo-PKC δ (Thr505) (#9374), anti-fosfo-Akt (#9275), anti-Akt (#9272), anti-fosfo-ERK1/2 (#9101), anti-ERK1/2 (#9102) y el anticuerpo monoclonal de conejo anti-receptor de insulina β (#3025), fueron adquiridos en Cell

Signaling (Beverly, MA, USA). Los anticuerpos primarios monoclonales de ratón anti-PKC α (#610107), anti-PKC δ (#610397) y anti-LAP-2 β (#611000) fueron adquiridos en BD Biosciences (San Jose, CA, USA). Los anticuerpos policlonales de conejo anti-calnexina (#11397) y anti-fosfo-p38 (Tyr 182) (#101759) fueron adquiridos de Santa Cruz Biotechnology. El anticuerpo policlonal de conejo anti-CRX fue generosamente provisto por la Dra. Cheryl Craft (University of Southern California, Los Angeles, USA). El anticuerpo monoclonal de ratón anti-rodopsina (Rho4D2) fue generosamente provisto por el Dr. Robert Molday (University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada). El anticuerpo secundario anti-conejo unido a Alexa fluor fue obtenido en Invitrogen y el anti-conejo unido a peroxidasa de rábano fue obtenido en Jackson Immuno Research Laboratories. Las sondas fluorescentes Ioduro de Propidio y Dapi fueron generosamente obsequiadas por el Dr. Enrique Politi y la Dra. Nora Rotstein.

2. MATERIAL BIOLÓGICO.

En este trabajo de tesis doctoral se emplearon retinas bovinas a partir de las cuales se obtuvieron las fracciones nucleares que constituyen el material de estudio.

Los ojos bovinos fueron obtenidos de un frigorífico local (frigorífico Viñuela, Bahía Blanca, Argentina), y fueron transportados al laboratorio en un recipiente cerrado, en hielo, hasta su procesamiento, tiempo que nunca superó las 3 hs luego de la muerte del animal. En las experiencias en las que se analizó el efecto del estímulo lumínico, los ojos bovinos desde la llegada al laboratorio, y antes de su utilización, se adaptaron a la oscuridad durante dos horas y media, y la manipulación de los mismos, previa al periodo de exposición a la luz, se realizó bajo luz roja.

2.1 Obtención de la retina bovina.

La disección de la retina se llevó a cabo a partir de los ojos bovinos enucleados. El ojo bovino se seccionó primero con un bisturí en un corte sagital (plano antero posterior

del globo ocular) de aproximadamente 1 cm. Luego se separó, cortando con tijera en una línea paralela al plano antedicho, y la mitad del ojo que contenía la lente y el humor vítreo (parte anterior del ojo) se descartó, mientras que la otra mitad se invirtió cuidadosamente para exponer la superficie neural de la retina. La retina se separó cuidadosamente del epitelio pigmentario con una espátula de bordes redondeados, despegándola desde el borde externo de la copa óptica hacia la zona del nervio óptico. Una vez desprendida, se cortó el nervio óptico para separarla y emplearla en la obtención de las fracciones nucleares.

2.2 Protocolo de aislamiento de los núcleos.

2.2.1 Obtención de los núcleos de la retina bovina.

La fracción nuclear de la retina fue obtenida por centrifugación diferencial a partir del homogenado total del tejido. El protocolo empleado constituye una adaptación de un protocolo utilizado para obtener núcleos de sistema nervioso central (Gaveglia y col., 2011) al que denominamos “método tradicional”. Una vez que las retinas fueron extraídas de las copas de los ojos, se llevó a cabo una homogeneización empleando sacarosa 0,25 M en *buffer* TKM (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, KCl 25 mM, MgCl₂ 5 mM y EGTA 1 mM) en presencia de los siguientes inhibidores de proteasas: PMSF 0,1 mM, aprotinina 1 µg/ml, pepstatina 1 µg/ml, leupeptina 2 µg/ml y DTT 1 mM (protector de sulhidrilos libres) para evitar la degradación proteolítica del tejido y la formación de puentes disulfuro, respectivamente. La relación tejido: volumen empleada fue del 30 % (p/ v). El procedimiento de homogeneización se realizó en un homogeneizador Potter Eveljhem, a una velocidad de 700 rpm. El homogenado fue posteriormente filtrado utilizando 4 capas de gasa para eliminar los restos de tejido, y al volumen obtenido se le adicionaron 2 volúmenes de sacarosa 2,3 M en *buffer* TKM para obtener un homogenado al 10 % (p/ v) con una molaridad final de 1,6 M. Dicho homogenado fue sembrado en tubos SW41 sobre una capa de sacarosa 2,3 M y centrifugado a 25.000 rpm durante 70 min en una ultracentrífuga Beckman Óptima 90-K. Se obtuvo un pellet

nuclear constituido por los núcleos provenientes de todos los tipos celulares de la retina bovina. El pellet nuclear fue puesto en contacto con un buffer salino de alta fuerza iónica (BAFI) (HEPES 50 mM pH 7,4, MgCl₂ 10 mM, KCl 80 mM, EGTA 2 mM y DTT 1 mM) durante 30 min en hielo, y luego de este periodo se llevó a cabo una resuspensión con movimientos suaves para evitar la ruptura de los núcleos. A esta fracción nuclear la llamamos FNR (fracción nuclear de la retina).

2.2.2 Obtención de los núcleos de las células fotorreceptoras de la retina bovina.

Cuando el objetivo del análisis fue evaluar los efectos de la exposición de las retinas bovinas a la luz a nivel nuclear, el protocolo antes mencionado (2.2.1) fue ligeramente modificado para obtener una fracción nuclear altamente enriquecida en los núcleos de las células fotorreceptoras, células en las que se inicia el proceso de la fototransducción. En este caso, al gradiente de sacarosa empleado en el “método tradicional”, se le adicionó una capa de sacarosa de mayor molaridad, de modo que el homogenado fue sembrado sobre dos capas de sacarosa de molaridad 2,4 M- 2,2 M en tubos SW41 y fue centrifugado a 25.000 rpm durante 70 min. Bajo estas condiciones se obtuvieron 2 preparaciones nucleares, una ubicada en la interface entre las capas de sacarosa 2,4 M- 2,2 M (constituida por los núcleos provenientes de todos los tipos celulares de la retina) y otra que constituye el pellet nuclear altamente enriquecido en los núcleos de las células fotorreceptoras. El pellet nuclear fue puesto en contacto con BAFI durante 30 min en hielo, y luego de este periodo se llevó a cabo una resuspensión con movimientos suaves para evitar la ruptura de los núcleos. A esta fracción nuclear enriquecida en los núcleos de los fotorreceptores la llamamos FNF (fracción nuclear de las células fotorreceptoras).

La Figura 1 describe los protocolos de obtención de las fracciones nucleares detalladas anteriormente (2.2.1 y 2.2.2).

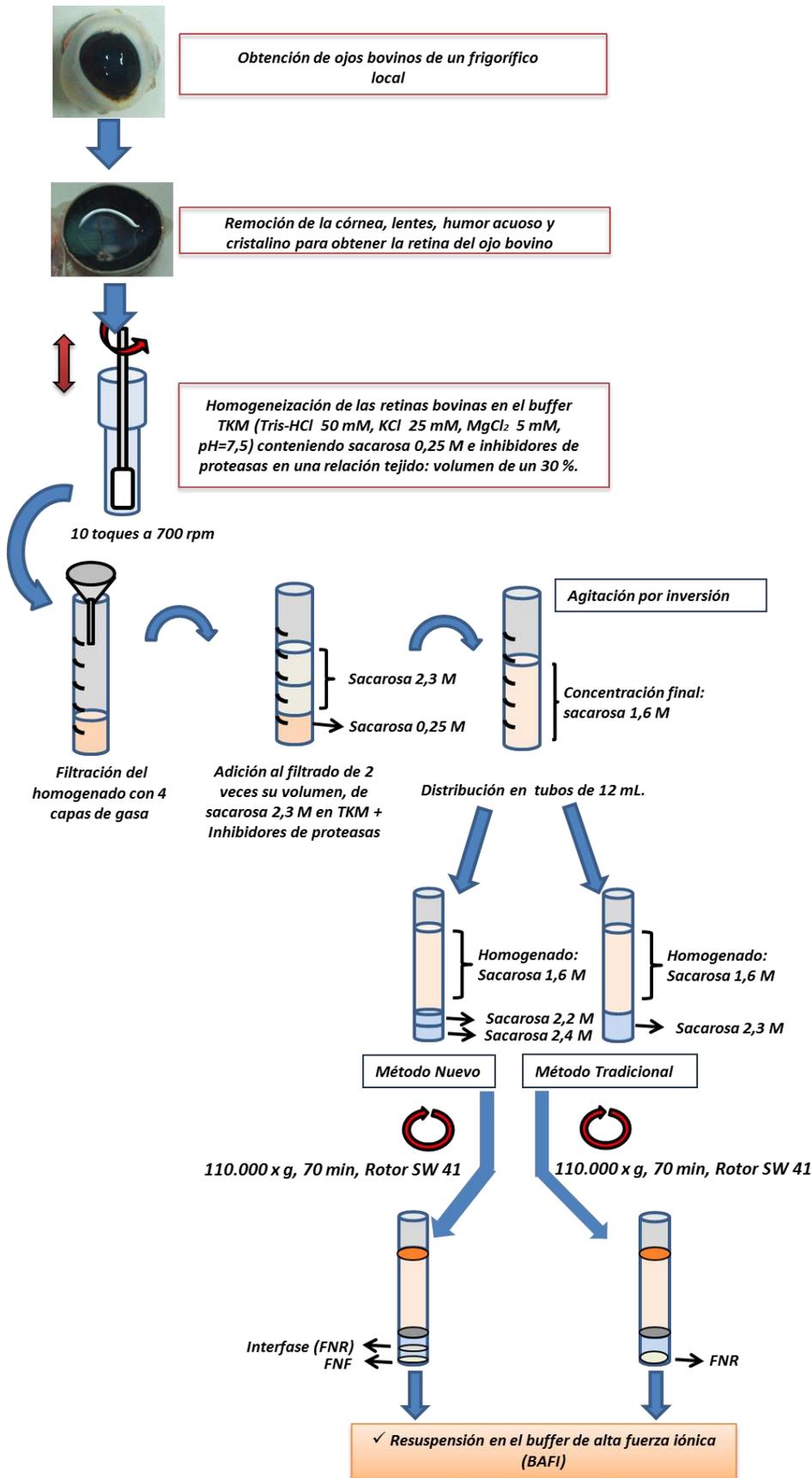


Figura 1. Protocolo de obtención de las fracciones nucleares de la retina bovina (FNR y FNF).

2.2.3 Análisis comparativo de las poblaciones nucleares obtenidas por el “método tradicional” y el “método nuevo”.

2.2.3.1 Tinción con sondas nucleares.

A un dado volumen de las suspensiones nucleares obtenidas por el “método tradicional” y el “método nuevo” (FNR y FNF, respectivamente) se le adicionó un volumen equivalente de paraformaldehído (PF) 4 % (concentración final del 2 %) para producir la fijación de los núcleos. Luego de 1 hora de contacto a temperatura ambiente, las muestras fueron centrifugadas a 4500 g (6000 rpm) durante 20 min y posteriormente resuspendidas en BAFI para finalizar el periodo de fijación. Un pequeño volumen de las suspensiones nucleares fue colocado en forma de gota en un portaobjetos y luego de un tiempo de secado de aproximadamente 30 min, fue incubado durante 25 min con la sonda nuclear fluorescente yoduro de propidio o durante 5 minutos con DAPI. Finalmente, se realizaron 3 lavados con BAFI (de 10 min cada uno) para su posterior observación en el microscopio confocal.

Las imágenes se obtuvieron usando un microscopio confocal LEICA TCS SP2 AOBS. Cuando se utilizó la sonda nuclear fluorescente DAPI, la observación se realizó utilizando un láser que excitó a la muestra en el rango ultravioleta, mientras que cuando la sonda nuclear empleada fue yoduro de propidio, el láser utilizado fue 488 nm. Las fracciones nucleares obtenidas fueron consideradas puras cuando, comparadas con la microscopía de transmisión, todos los núcleos presentes en las imágenes fueron positivos a las sondas nucleares antes mencionadas.

2.2.3.2 Microscopía electrónica de transmisión.

Las suspensiones nucleares obtenidas por ambos métodos fueron fijadas con glutaraldehído al 2,5 % (p/ v), durante 1 hora a temperatura ambiente (fijación de las proteínas). Luego se realizaron 3 lavados con BAFI, y se agregó tetraóxido de osmio (OsO_4) para fijar los lípidos de las muestras, durante una hora. Finalmente, luego de 3

lavados con BAFI, se realizó una deshidratación de las muestras utilizando concentraciones crecientes de acetona, seguida de la inclusión de las mismas en la resina epóxido al 1 %, y del corte de los tacos en un ultramicrotomo. Los cortes finos del material en estudio fueron teñidos con acetato de uranilo y citrato de plomo, y posteriormente fueron observados en el Microscopio electrónico de transmisión JEOL 100 CXII operado a 80 KV, para la obtención de imágenes, mostradas en la sección de resultados.

2.2.3.3 Western Blot.

Se determinó el contenido de CRX (un factor de transcripción específico de las células fotorreceptoras de la retina) en las suspensiones nucleares obtenidas por ambos métodos, utilizando como control de carga a la proteína nuclear LAP-2 β , empleando la técnica de inmunodetección de proteínas por *western blot* (WB), que se detalla más adelante (5.).

3. PROTOCOLO DE EXPOSICIÓN DE LAS RETINAS BOVINAS A LA LUZ.

Para evaluar el efecto de la luz sobre la población nuclear de células fotorreceptoras, los ojos bovinos fueron adaptados a la oscuridad durante 2 h y 30 min. Luego, la córnea, los lentes oculares y el humor acuoso fueron removidos de los mismos siguiendo el protocolo detallado en 2.1 de materiales y métodos. Las copas de los ojos fueron colocadas en los recipientes adecuados, y unos minutos previos a la exposición a la luz, se vertió en su interior un volumen suficiente para llenarlas (aproximadamente 10 ml) de medio iónico Ames conteniendo glucosa 0,5 %, descrito por Ames-Hastings (AMES, III y HASTINGS, 1956). Dicho medio iónico fue preparado previamente con NaCl 119,5 mM, KCl 3,6 mM, NaH₂PO₄ 0,1 mM, Na₂HPO₄ 0,4 mM, MgSO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 1,15 mM, NaHCO₃ 22,6 mM y fue llevado a pH 7,33 mediante el burbujeo de gas carbógeno (O₂: CO₂, 95: 5, v/v) durante 15 min. La incubación del tejido con medio Ames permite que el tejido pueda mantener las condiciones de viabilidad durante el

periodo del estímulo. En estas condiciones, las copas de los ojos fueron expuestas a la luz ($280 \text{ candelas/m}^3 = 3000 \text{ luxes}$) o fueron mantenidas en oscuridad, durante 30 min. Luego de este período, las retinas fueron disecadas de las copas de los ojos como se detalló en 2.1, y posteriormente se llevaron a cabo los protocolos de aislamiento de los núcleos, como se explicó en 2.2.1 o 2.2.2, de acuerdo a si el objetivo era obtener los núcleos de la retina bovina o los núcleos de las células fotorreceptoras de la retina bovina respectivamente, o ambos.

3.1 Incubación de las retinas bovinas con inhibidores enzimáticos y posterior exposición a la luz y a la oscuridad.

Luego de 2 h y 30 min de adaptación a la oscuridad, se obtuvieron las copas de los ojos por eliminación de la córnea y demás componentes externos del ojo, como se describió en 2.1. A las copas de los ojos se les incorporaron aproximadamente 10 ml de medio Ames (cuya composición fue definida en 3.) al cual previamente se le adicionaron los inhibidores enzimáticos en estudio (condiciones experimentales), o sus respectivos vehículos (condiciones control). Después de 15 min de incubación en estado de reposo con iluminación de lámpara roja, la mitad de las copas de los ojos bovinos de cada condición fue mantenida bajo luz roja (condición control de luz), mientras que la otra mitad fue expuesta a la luz en las condiciones explicadas en 3. La fracción nuclear de las células fotorreceptoras fue obtenida como se indicó previamente (2.2.2).

3.2 Ensayos para determinar si el modelo de luz-oscuridad utilizado induce daño.

3.2.1 Ensayo de detección de peroxidación lipídica en el homogenado de la retina bovina.

Se determinaron los niveles de peroxidación lipídica en los homogenados provenientes de retinas previamente expuestas a la luz o mantenidas en oscuridad mediante el

ensayo de determinación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (*TBARS*) como fue previamente descrito (Uranga y col., 2007). Después del periodo de exposición a la luz o a la oscuridad, a 0,5 ml de homogenado de retina (200 µg de proteínas) se le adicionó 1 ml de ácido tricloroacético 30 %, seguido de 0,1 ml de HCl 5 N y 1 ml de ácido tiobarbitúrico 0,75 %. Posteriormente, los tubos de reacción fueron calentados a 100 °C durante 15 min en un baño de agua. Por último, luego de un periodo de reposo a temperatura ambiente (periodo de enfriamiento), las muestras fueron centrifugadas a 1.000 g durante 10 min.

Las *TBARS* (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico) fueron medidas en el sobrenadante a 535 nm y los resultados fueron expresados en unidades de absorbancia a 535 nm por mg de proteínas.

3.2.2 Análisis del daño al ADN por tinción con sondas fluorescentes y observación por microscopía confocal.

Las fracciones nucleares provenientes de las retinas expuestas a la luz o mantenidas en oscuridad fueron tratadas con las sondas fluorescentes Ioduro de propidio y DAPI para su observación en el microscopio confocal, como fue detallado en 2.3.1. Dado que el objetivo del siguiente análisis fue determinar si el modelo de exposición a la luz induce daño nuclear, se tomaron y evaluaron las imágenes correspondientes a distintos planos focales de las muestras con el fin de identificar una posible fragmentación del ADN.

4. ENSAYOS ENZIMÁTICOS EMPLEADOS PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD DIACILGLICEROL QUINASA (DAGK).

La actividad DAGK fue determinada usando los siguientes sustratos radioactivos: DAG-[³H] y ATP-[γ-³²P] y midiendo los niveles de ácido fosfatídico (PA) radiomarcado. En el primer caso se obtuvo PA-[³H] y en el segundo, PA-[³²P].

En los experimentos en que fue utilizado DAG-[³H] como sustrato radiomarcado, se empleó ATP no marcado como cosustrato de la reacción enzimática. En aquellos casos en que se utilizó ATP-[γ -³²P], se emplearon como cosustratos de la reacción enzimática DAG endógeno ó diacilglicéridos exógenos de diferente composición en ácidos grasos (1,2-dioleoilglicerol (DOG) y 1-estearoil, 2-araquidonoilglicerol (SAG)).

4.1 Determinación de la actividad DAGK en los núcleos de la retina bovina.

4.1.1 Obtención de DAG-[³H] de la retina bovina.

4.1.1.1 Incubación de las retinas.

Para la obtención del DAG-[³H], uno de los sustratos radiomarcados utilizados en los ensayos enzimáticos destinados a determinar la actividad DAGK, se llevó a cabo la biosíntesis del lípido en las retinas bovinas a partir de glicerol-[2-³H] como sustrato radioactivo. Para ello, las retinas extraídas de los ojos bovinos como se detalló en 2.1, fueron incubadas en un baño termostatzado a 37 °C con agitación suave y continua, en erlenmeyer de 250 ml, provistos de tapón de goma con dos agujas, para la entrada y la salida de gas carbógeno (O₂: CO₂, 95: 5, v/v). La aguja de entrada fue de mayor calibre que la de salida, para mantener sobre la superficie del líquido una presión de gas conveniente. El gas se hizo burbujear en una trampa de agua destilada para mantener la humedad del mismo durante la incubación.

El medio utilizado para realizar la incubación fue una solución iónica de pH 7,33 (medio Ames) cuya composición ha sido detallada previamente (3.). El volumen de medio utilizado fue de 7 ml/ retina, a razón de 5 retinas por erlenmeyer de 250 ml y en presencia de 10 μ Ci/ retina de glicerol-[2-³H] con una actividad específica de 16 Ci/mmol.

4.1.1.2 Extracción de los lípidos neutros.

Los lípidos fueron extraídos del tejido con una mezcla de cloroformo y metanol (C: M, 2: 1, v/v) según Folch (FOLCH y col., 1957), utilizando un homogenizador Potter-

Elvejhem, a 700 rpm con vástago de teflón. La suspensión de las proteínas desnaturalizadas en el solvente orgánico y los lípidos en solución fue filtrada. El extracto (crudo) fue transferido a un erlenmeyer con tapón de vidrio esmerilado, el cual fue gaseado con N₂ y guardado en la heladera durante 24 hs. Posteriormente, para purificar el extracto y extraer las moléculas no lipídicas presentes, se realizó una partición con una solución acuosa conteniendo KCl 0,88 % y glicerol 0,1 % en una proporción de 0,2 veces el volumen del solvente orgánico final. Se agitó y se dejó en heladera el tiempo necesario para separar las fases acuosa-metanólica y orgánica-clorofórmica. Antes de desechar a la fase superior (acuosa-metanólica), se marcó sobre el erlenmeyer el volumen ocupado por la misma. Luego de descartar a la fase superior con una pipeta Pasteur, la fase orgánica fue mezclada con un volumen de fase superior teórica (FST) (Cloroformo: Metanol: KCl: glicerol, 3: 48: 47: 0,1 %, v/v) equivalente al descartado previamente. Este procedimiento se repitió entre 2 y 4 veces para eliminar el precursor radioactivo no incorporado a los lípidos. Los lípidos obtenidos, que permanecieron en la capa clorofórmica, se concentraron bajo nitrógeno (N₂) y el extracto lipídico purificado y gaseado con N₂ se mantuvo en freezer a -20 °C para el posterior aislamiento de sus componentes.

4.1.1.3 Separación de los lípidos por cromatografía en capa fina.

Para separar los lípidos se utilizó la técnica de cromatografía en capa fina (TLC), empleando placas de vidrio (20 cm x 20 cm) como soporte y una suspensión de sílica gel G o H (dependiendo de los lípidos a separar). Las placas fueron preparadas utilizando un extensor de placas Shandon y tuvieron un espesor de 600 µm. Las mismas fueron activadas previamente a su uso, por calentamiento a 100 °C en una estufa de secado durante 1 h. La siembra del extracto resuspendido en cloroformo se realizó luego del enfriado de la placa, bajo atmósfera de N₂, para preservar la composición de los lípidos del extracto. Los lípidos de las muestras fueron separados en sistemas monodimensionales que permiten la separación entre los fosfolípidos y los

lípidos neutros. Cuando las muestras fueron sembradas en las placas de sílica gel H, las cuales fueron preparadas en una solución de acetato de magnesio al 0,3 %, el sistema de solventes utilizado fue: Cloroformo: Metanol: H₂O (C: M: H₂O, 65: 25: 4, v/v), mientras que cuando las muestras fueron sembradas en las placas de sílica gel G, también preparadas en una solución de acetato de Magnesio al 0,3 %, el sistema de solventes utilizado fue Cloroformo: Metanol: Agua: Amoníaco (C: M: H₂O: NH₃, 90: 10: 0,5: 0,5, v/v). Luego, los lípidos neutros fueron eluidos según la técnica de Arvidson (Arvidson, 1968) y posteriormente separados en sistemas que permiten la separación de los lípidos neutros entre sí, como por ejemplo, Hexano: Eter: Ácido Acético (H: E: Ac Ac, 70: 30: 2,3, v/v). El sistema de solventes constituido por: Cloroformo: Metanol: Agua: Amoníaco (C: M: H₂O: NH₃, 90: 10: 0,5: 0,5, v/v) con sílica gel G, resultó ser el sistema más adecuado para la separación de los lípidos de interés, ya que además de resolver a los lípidos neutros de los fosfolípidos, también permitió la separación entre los lípidos neutros y el colesterol, lo cual evita interferencias de este último en la purificación de los diacilglicéridos (DAG-[³H]) (el colesterol posee un R_f similar al de los DAG). Cada corrida cromatográfica fue realizada en presencia de estándares adecuados para la identificación de los lípidos de interés.

4.1.1.4 Visualización de los lípidos.

Para visualizar la posición de los lípidos separados por cromatografía en capa fina, las placas fueron expuestas a vapores de yodo (I₂). El I₂ se fija a las dobles ligaduras de los ácidos grasos, componentes de los glicerolípidos, por lo tanto, la aparición de manchas marrones o amarillas indica la presencia de los mismos.

En los casos de las muestras destinadas a ser utilizadas como sustrato o las muestras que deben ser extraídas de la placa cromatográfica para una posterior corrida en otro sistema de solventes, la exposición a vapores de I₂ está contraindicada debido a la ruptura del doble enlace de las moléculas. Por esta razón, para visualizar la posición

de los lípidos de interés en estos casos, las placas fueron rociadas con 2',7'-dichlorofluoresceína al 0,05 % en metanol. Los lípidos se visualizaron bajo luz ultravioleta. Estos procedimientos se realizaron bajo atmósfera de N₂ para minimizar la peroxidación de los ácidos grasos insaturados.

4.1.2 Ensayo enzimático para determinar la actividad DAGK utilizando DAG-[³H].

La actividad DAGK fue determinada en los núcleos de la retina bovina siguiendo el procedimiento que se detalla a continuación. Un volumen apropiado de diacilglicerol radioactivo (DAG-[³H]) (30000 dpm/ muestra) fue evaporado bajo atmósfera de nitrógeno (N₂) en un tubo de vidrio y luego fue resuspendido en un dado volumen de Tritón X-100 para obtener una concentración final de 15 mM de detergente. Dado que el procedimiento de biosíntesis del DAG-[³H] está estandarizado y el tiempo de incubación corresponde a la condición de equilibrio, la Actividad Específica del DAG obtenido asegura que en cada muestra (200 µl) el contenido de DAG total sea de aproximadamente 13-15 µM. Antes de la incubación, la FNR (100 µg de proteínas) fue sonicada durante 15 segundos con ATP 2 mM (el cosustrato de la reacción enzimática), y la suspensión de detergente-lípido radioactivo fue sonicada en un baño de agua (Sonicador Branson).

El ensayo enzimático fue realizado a temperatura constante de 37 °C, en un baño termostatzado con agitación continua. El tiempo de incubación fue de 10 min a partir del agregado de los núcleos, en un volumen final de 200 µl. En los casos en donde se utilizaron inhibidores, se realizó una preincubación de 10 min de la FNR resuspendida en el buffer de reacción con los inhibidores enzimáticos o con sus vehículos (condiciones control) y posteriormente se agregó el sustrato radioactivo, comenzando con la incubación de 10 min. El buffer utilizado en el ensayo enzimático para la DAGK, fue buffer Hepes de alta fuerza iónica a un pH de 7,4 (BAFI).

La reacción enzimática fue frenada por el agregado de 3 ml de Cloroformo: Metanol (C: M, 2: 1, v/v) y los lípidos fueron extraídos siguiendo la técnica de Folch. Los productos de la reacción enzimática fueron separados por TLC monodimensional empleando placas de sílica gel G. Para tal fin, el extracto lipídico de la FNR ensayada fue sembrado en banda (1 cm) adicionando en cada extremo una gota (25 μ l/ 50 μ g) de un extracto de lípidos de la retina bovina. Este procedimiento se realiza debido al escaso contenido de lípidos en los núcleos. El PA- 3 H] fue separado de los demás componentes de la reacción enzimática en un sistema de solventes compuesto por: Hexano: Eter: Ácido Acético (H: E: Ac Ac, 30: 70: 2,3, v/v) (Figura 2a). Los lípidos fueron visualizados por la exposición de los cromatogramas a los vapores de yodo (manchas amarillas a marrones) y se identificaron adecuadamente usando los correspondientes estándares. Las manchas correspondientes a PA- 3 H] (en el origen) y DAG- 3 H] remanente fueron raspadas y colocadas en viales para la cuantificación de la radioactividad por espectroscopía de centelleo líquido.

4.2 Determinación de la actividad DAGK en los núcleos de las células fotorreceptoras de la retina bovina.

4.2.1 Ensayo enzimático para determinar la actividad DAGK utilizando DAG- 3 H].

El sustrato radioactivo, DAG- 3 H], utilizado para determinar la actividad DAGK en los núcleos de las células fotorreceptoras de la retina bovina, fue obtenido como se explicó en 4.1.1. El ensayo enzimático se llevó a cabo siguiendo el procedimiento detallado en 4.1.2.

4.2.2 Ensayo enzimático para determinar la actividad DAGK utilizando ATP- $[\gamma$ - 32 P].

Cuando la actividad DAGK fue determinada usando ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$, el ensayo enzimático se realizó en presencia de 3 μCi del sustrato radioactivo y de DAG endógeno, o de sustratos exógenos tales como el DOG 500 μM o el SAG 500 μM .

Las condiciones de ensayo fueron las siguientes: temperatura constante de 37 °C, en baño termostatzado con agitación continua y tiempo de incubación de 10 min a partir del agregado de la FNF (100 μg de proteína), en un volumen final de 200 μl . La suspensión nuclear fue sonicada con el ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ durante 15 segundos en un baño sonicador con el objetivo de introducir el ATP en el interior de los núcleos, previo a su incubación. En los casos en donde se utilizaron inhibidores o activadores enzimáticos, se realizó una preincubación de la FNF con los mismos (o con sus vehículos, condiciones control) durante 10 min y posteriormente se realizó la incubación, durante 10 min, que fue iniciada con el agregado del sustrato radioactivo. El buffer utilizado en el ensayo enzimático para determinar la actividad DAGK, fue buffer Hepes de alta fuerza iónica (BAFI) a un pH de 7,4, ya detallado en 4.1.2. En ciertos casos en los que se utilizaron sustratos lipídicos exógenos (DOG o SAG), los mismos fueron suspendidos en el buffer conteniendo algún agente detergente para obtener micelas de lípido-detergente, que dependiendo de los objetivos del ensayo fueron: β octilglucósido (OG) 50 mM, Octil fenol etoxilato, polioxietilen octil fenil éter (Tritón X-100) 15 mM o deoxicolato de sodio (DCNa) 1 mM, detallado en 4.2.2.4.

Los lípidos del tejido fueron extraídos empleando la técnica de Folch con algunas modificaciones que permiten favorecer la extracción de los lípidos ácidos, tales como el PA y los fosfoinosítidos (Giusto e Ilincheta de Boschero, 1986). A los tubos de ensayo con la suspensión nuclear ensayada se les incorporaron 3 ml de Cloroformo: Metanol (C: M, 1: 1, v/v), procedimiento que frena la actividad enzimática por desnaturalización de las proteínas. Posteriormente se agregó 1 ml de Cloroformo: Metanol: Ácido clorhídrico concentrado (C: M: HCl, 1: 1: 0,06, v/v) y el volumen fue completado con 2 ml de cloroformo de tal forma de tener una relación de Cloroformo: Metanol (C: M, 2: 1, v/v). La mezcla ácida fue agitada, y posteriormente se mantuvo

en reposo durante 1 h a temperatura ambiente. Luego del periodo de reposo, se agregaron 0,2 volúmenes de agua y se agitó vigorosamente en vortex. Este procedimiento permite la formación de un sistema bifásico con una fase orgánica y una fase acuosa-metanólica. Las muestras fueron centrifugadas y la fase superior (acuosa-metanólica) fue descartada. A la fase inferior clorofórmica se le realizaron 4 lavados con fase superior teórica (FST), Cloroformo: Metanol: Agua (C: M: H₂O, 3: 48: 47, v/v), incorporando en los tubos de ensayo un volumen equivalente al previamente extraído. El fin de dichos lavados es eliminar el radioactivo que queda sin reaccionar. La fase inferior clorofórmica se secó bajo corriente de N₂. Este procedimiento permite la eliminación del ácido clorhídrico del solvente orgánico acidificado, por evaporación. Luego se procedió a concentrar el extracto en el fondo del tubo mediante la adición de solvente orgánico neutro. Finalmente, se resuspendió en una mínima proporción de solvente (C: M, 2: 1, v/v) y se sembró en placas de sílica para TLC, previamente activadas a 100 °C por 1 h. Para separar el producto de la reacción enzimática, PA-[³²P], se utilizaron placas de sílica gel H preparadas con una solución de oxalato de potasio al 1 % p/ v. La siembra del extracto de los lípidos nucleares se realizó en bandas de 1 cm y se colocó en ambos extremos de cada banda una gota (25 µl/ 25 µg) de extracto lipídico de retina tal como fue indicado previamente en 4.1.2. Los lípidos se resolvieron en un sistema compuesto de Cloroformo: Acetona: Metanol: Ácido Acético: Agua (C: A: M: AcAc: H₂O, 40: 15: 13: 12: 7,5; v/v) (Figura 2b). Los lípidos fueron visualizados por la exposición de las placas cromatográficas a vapores de I₂, y se identificaron adecuadamente usando los estándares apropiados. Las manchas correspondientes al PA-[³²P] (a 2 cm del frente del solvente) y a los polifosfoinosítidos-[³²P] fueron raspadas y colocadas en viales para determinar su radioactividad por espectrometría de centelleo líquido.

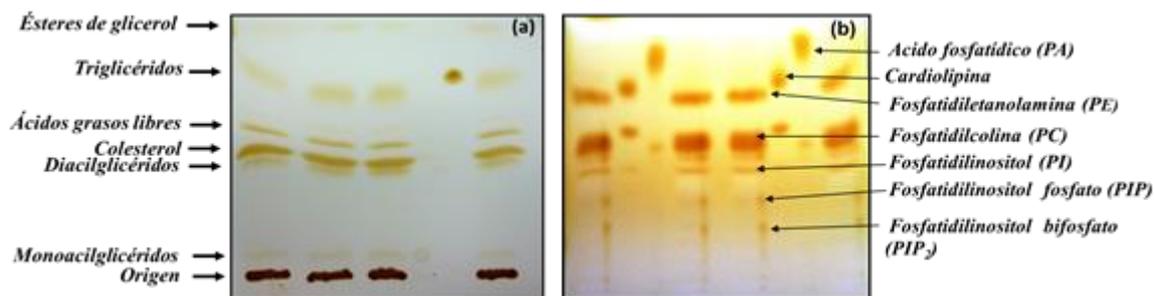


Figura 2. Cromatografía en capa fina para el aislamiento de PA-[³H] y PA-[³²P].

(a) Muestras sembradas en placas de sílica gel G, y resueltas en el sistema de solventes H: E: AcAc (30: 70: 2,3, v/v) para la obtención de PA-[³H].

(b) Muestras sembradas en placas de sílica gel H, y resueltas en el sistema de solventes H: C: A: M: AcAc: H₂O (40: 15: 13: 12: 7,5, v/v) para la obtención de PA-[³²P].

4.2.2.1 Determinación de los parámetros cinéticos de las DAGK en los núcleos de las células fotorreceptoras de la retina bovina.

La actividad DAGK fue determinada en la FNF en función del tiempo de ensayo, de la concentración de proteínas utilizada en el ensayo, y de las concentraciones del sustrato (DAG) y del cosustrato de la reacción enzimática (ATP). Cuando la actividad DAGK fue determinada en función del tiempo de ensayo y de la concentración de proteínas se utilizaron 3 μ Ci de ATP-[γ -³²P] (250 μ M de ATP) por tubo, y DOG en una concentración final de 500 μ M. La actividad DAGK fue determinada en función de la concentración de ATP utilizando concentraciones crecientes del mismo y DOG 500 μ M. En el ensayo realizado en función de la concentración de DAG, se utilizaron concentraciones crecientes de DOG y ATP-[γ -³²P] 4 mM por tubo. Las concentraciones saturantes para cada sustrato fueron decididas sobre la base de datos previos.

Un volumen apropiado de la solución de DOG fue evaporado bajo corriente de N₂ en un tubo de vidrio, fue resuspendido en el buffer de ensayo de la DAGK (BAFI) y posteriormente sonificado en un sonicador (sonicador Branson). Antes de la incubación,

la suspensión nuclear fue sonicada durante 15 segundos con el sustrato radioactivo y el lípido en un baño de agua (sonicador Branson).

La reacción enzimática fue llevada a cabo como se describió previamente en 4.2.2.

4.2.2.2 Efecto de agentes tensoactivos sobre la generación de PA.

Cuando se evaluó el efecto de los detergentes en la generación de PA a partir de DAG, se realizaron micelas lípido-detergentes, usando sustratos exógenos tales como DOG y SAG (500 μ M) en presencia de ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ 250 μ M y los siguientes detergentes: Tritón X-100 15 mM, OG 50 mM y DCNa 1 mM.

Para preparar las micelas de lípido-detergente, se tomó una alícuota del sustrato lipídico de concentración conocida y se secó bajo corriente de N_2 en un tubo de teflón. Luego, se resuspendió en el buffer de ensayo conteniendo el detergente. La concentración del lípido y del detergente en la micela fue de 4 X, de forma tal de lograr la concentración deseada en un volumen de 50 μ l, para un volumen final de ensayo de 200 μ l. El tubo de ensayo con el lípido suspendido en el buffer se sonicó en un sonicador Branson. El ensayo para medir la actividad DAGK se realizó siguiendo el procedimiento explicado en 4.2.2.

5. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT (WB).

Para llevar a cabo los ensayos de WB, los *pellets* nucleares fueron suspendidos en el buffer de lisis RIPA (Tris 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, Tritón X-100 1 %, DCNa 0,5 %, SDS 1 %). Luego de centrifugar las suspensiones, los sobrenadantes conteniendo las proteínas nucleares fueron colectados. Posteriormente las soluciones fueron tratadas con un volumen adecuado de buffer Laemly 4 X (Tris 0,25 M pH 6,8, SDS 8 %, glicerol 40 %, 2-mercaptoetanol 20 %) en una proporción de 1:3 (Laemli 4X: Muestra) y fueron hervidas a 100 °C por 5 min (Laemli, 1970) con el fin de desnaturalizar las proteínas nucleares. A continuación, un volumen de muestra de cada condición equivalente a 40 μ g de proteínas, fue sembrado en las calles de un gel de

poliacrilamida al 10 % (porcentaje ideal para separar proteínas de peso molecular entre 0 y 120 kDa) y las proteínas se resolvieron utilizando buffer de electroforesis (Tris 5 mM pH 8,3, glicina 40 mM, SDS 0,2 %). La corrida electroforética se realizó a voltaje variable y amperaje constante de 20 miliamperes (mA) durante aproximadamente 2 hs.

Culminada la electroforesis, las proteínas resueltas en el gel se transfirieron a una membrana de PVDF (Immobilon, Millipore) utilizando un Mini Trans-blot cell electroblotter (BIO-RAD Life Science Group, California) a 350 mA (voltaje variable) durante 1 h y 30 min utilizando buffer de transferencia (Tris 48 mM pH 9,2, glicina 39 mM, metanol 20 %, SDS 0,035 %).

La inmunodetección de las proteínas de estudio se llevó a cabo de la siguiente manera:

-Hidratación de las membranas con Tris Buffer Salino /Tween 20 (TBS-T) (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween 0,1 %).

- Bloqueo de las membranas durante 2 hs a temperatura ambiente con albumina de suero bovino (BSA) al 10 % en solución con TBS-T.

- Incubación con el anticuerpo primario específico para detectar las proteínas de interés, diluido en solución de bloqueo (BSA 2 %). El tiempo de incubación y la dilución de anticuerpo utilizada fue dependiente de las características del anticuerpo primario, siendo de 2 hs a temperatura ambiente para los anticuerpos de conejo anti-pPKC α / β II (1: 2.000, v/v), anti-pPKC δ (1: 1.000, v/v), anti-CRX (1: 2.000, v/v), anti-calnexina (1: 1.000, v/v), y los anticuerpos de ratón anti-PKC α (1: 1.000,v/v), anti-PKC δ (1: 1.000, v/v) y anti-LAP2 β (1: 2.000,v/v), y de toda la noche a 4 °C en el caso de los anticuerpos de conejo anti-DAGK α (1: 500, v/v), anti-DAGK β (1: 500, v/v), anti-DAGKy (1: 500, v/v), anti-DAGK ϵ (1: 1.000, v/v), anti-DAGK ζ (1: 1.000, v/v), anti-DAGK θ (1: 1.000, v/v), anti-Receptor de Insulina (1: 500, v/v), anti-pERK (1: 1.000, v/v), anti-ERK (1: 1.000, v/v), anti-fosfo-p38 (1: 1.000, v/v), anti-pAKT (1: 500, v/v), anti-AKT (1: 1.000, v/v) y el anticuerpo de ratón anti-opsina (1: 1.000, v/v).

- 3 lavados de 10 min con TBS/T
- Incubación con el anticuerpo secundario diluido en la solución de bloqueo (BSA 2 %) durante 2 hs a temperatura ambiente y con suave agitación. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: anti-ratón para detectar a los anticuerpos primarios de ratón, y anti-conejo, para detectar a los anticuerpos primarios de conejo. La dilución de anticuerpo secundario utilizada varió en todos los casos, dependiendo de las características del anticuerpo primario.
- 3 lavados de 10 min con TBS/T.
- Las inmunoreacciones se detectaron mediante quimioluminiscencia utilizando el reactivo ECL Plus Western Blotting Detection Sistem (GE Healthcare) y placas fotográficas (Hiperfilm™, Amersham®) para visualizar las bandas. Las intensidades de las bandas obtenidas en las imágenes fueron cuantificadas usando el software ImageJ 1.38 (NHI, Bethesda, MD, EE.UU).

6. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.

Un volumen adecuado de las suspensiones nucleares fue fijado con PF, centrifugado, resuspendido y a continuación las suspensiones nucleares fueron colocadas en portaobjetos en forma de gotas, secadas, permeabilizadas y lavadas tal como se indicó en 2.2.3.1.

Luego de tres lavados con BAFI, los sitios inespecíficos de la proteína de interés fueron bloqueados con BSA al 5 % p/v en BAFI durante 1 h. Posteriormente se realizaron las incubaciones con los respectivos anticuerpos primarios diluidos en una solución de BSA al 5 % en BAFI, en una dilución adecuada, (1: 50, v/v) cuando se utilizó el anticuerpo primario de conejo anti-receptor de insulina, y (1: 100, v/v) cuando se utilizó el anticuerpo primario de conejo anti-DAGKζ. En ambos casos el tiempo de incubación fue de toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, las muestras se lavaron 3

veces con BAFI y se incubaron con los respectivos anticuerpos secundarios conjugados con sondas fluorescentes, en una dilución adecuada para cada caso: (1: 200, v/v) cuando se utilizó el anticuerpo secundario unido a FITC para detectar a la DAGK ζ , y una dilución de (1: 2.000, v/v) cuando se utilizó el anticuerpo secundario unido a Alexa Flúor para detectar al receptor de insulina. Las muestras fueron lavadas 3 veces y se acondicionaron para su observación en un microscopio confocal TCS-SP2 (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Germany) equipado con un divisor de haz acústico-óptico y un objetivo de inmersión en agua 63 X (apertura numérica= 1,2). Paralelamente, se realizaron los controles negativos, incubando a las suspensiones nucleares únicamente con los anticuerpos secundarios (se omite la incubación con los anticuerpos primarios para detectar una posible señal fluorescente inespecífica, debida al tratamiento con los anticuerpos secundarios fluorescentes). La intensidad de la fluorescencia de las imágenes fue cuantificada usando el software ImageJ 1.38 (NHI, Bethesda, MD, EE.UU).

7. MÉTODOS ANALÍTICOS

7.1 *Cuantificación de la radioactividad por espectrometría de centelleo líquido.*

Los lípidos de interés separados por cromatografía en capa fina, fueron raspados de las placas de sílica y transferidos a viales para la cuantificación de la radioactividad emitida por cada uno de ellos. A cada vial se le agregaron 250 μ l de agua destilada con la finalidad de desactivar la sílica, y 5,5 ml de líquido de centelleo constituido por Preblended dry fluor 2a70 4 % (PPO 98 % y bis- MSB 2 %, Reserch Products International Corp. USA) en tolueno: Tritón X-100 (4: 1, v/v). Posteriormente las viales fueron agitadas vigorosamente y la radioactividad se midió utilizando un contador de centelleo líquido Wallak Oy, modelo 1214 Rackbeta.

7.2 Cuantificación de las proteínas.

La cuantificación de las proteínas se llevó a cabo utilizando el kit RC DC protein assay (BIO RAD) el cual se basa en el método de Lowry (LOWRY y col., 1951).

Las proteínas fueron solubilizadas en dodecil sulfato de sodio (SDS) 10 % (concentración final de SDS 5 %) y a continuación se incorporaron volúmenes adecuados de una serie de reactivos del Kit de reacción, siguiendo las instrucciones que se detallan en el mismo. Este es un método colorimétrico en el cual el color resultante se debe a una serie de reacciones químicas que ocurren en dos etapas. En la primer etapa, los iones cobre (Cu^{2+}) en medio alcalino forman un complejo con el nitrógeno de los enlaces peptídicos, provocando el desdoblamiento de la estructura tridimensional de las proteínas, y la exposición de los residuos fenólicos de las tirosinas y los triptófanos. El color resultante de esta reacción es azul claro. Luego, el reactivo de Folin-Ciocalteau (ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo) es reducido por los grupos fenólicos que quedaron expuestos en la primera etapa, y esta reacción le confiere a las muestras una coloración azul intenso.

Tras un periodo de 15 min a temperatura ambiente, se realizaron las lecturas de absorbancia a 750 nm. Paralelamente se realizó una curva de calibrado utilizando una solución de albúmina de suero bovino (BSA) 2 mg/ ml como estándar. La cuantificación de las proteínas de las muestras se realizó extrapolando sus valores de absorbancia en la curva de calibrado antes mencionada.

8. MÉTODOS ESTADÍSTICOS PARA ANALIZAR LOS DATOS EXPERIMENTALES.

La significatividad de los datos obtenidos en los experimentos (diferencias entre las condiciones experimentales y sus respectivos controles) se analizó utilizando el test "t" de Student o el análisis de Varianzas (Anova de una o dos vías, según

correspondiera). Todos los experimentos llevados a cabo en este trabajo de tesis se repitieron al menos tres veces, y empleando un *pool* de material biológico proveniente de un mínimo de 6 animales, realizando las determinaciones por triplicado en cada procedimiento experimental. Los datos graficados corresponden a la media \pm desviación estándar (SD) de las muestras ($***p < 0,001$; $**p < 0,01$; $*p < 0,05$).

RESULTADOS

CAPÍTULO I: “Estudio de las DAGK en los núcleos de la retina bovina. Efectos de la luz sobre vías de señalización lipídicas en los núcleos de las células fotorreceptoras”

I.1 DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA Y DE LA ACTIVIDAD DAGK EN LOS NÚCLEOS DE LA RETINA BOVINA.

I.1. 1 Evaluación del modelo experimental. Pureza de la fracción nuclear de la retina bovina (FNR).

La fracción nuclear de la retina bovina (FNR) fue obtenida en base al procedimiento que Gaveglio y colaboradores, en nuestro grupo de trabajo, utilizara para el aislamiento de una fracción nuclear de cerebelo (Gaveglio y col., 2011). Esta metodología se fundamenta, a su vez, en el método de Blobell & Potter para el aislamiento de núcleos de hígado (Blobel and Potter, 1966; Divecha y col., 1993). Aunque este protocolo de fraccionamiento no es muy usual, ya que no permite la obtención posterior de otras fracciones subcelulares de menor tamaño, es muy efectivo para separar en forma rápida una fracción nuclear muy purificada. El tamaño y la densidad de los núcleos permiten que los mismos atraviesen en forma selectiva una capa de sacarosa de elevada molaridad (2,3 M). El resto de las estructuras subcelulares, de menor tamaño y densidad, tales como el segmento externo e interno, las mitocondrias y el retículo endoplásmico, se distribuyen en una capa de densidad intermedia (1,6 M).

Tal como se indicó en Materiales y Métodos, se realizó una tinción de los núcleos con ioduro de Propidio para evaluar, en principio, la pureza de la fracción nuclear (Figura 1). La observación por microscopía de fluorescencia nos permitió determinar que este método es muy eficiente para la obtención de una fracción nuclear de la retina bovina, ya que no se advirtieron otras organelas subcelulares ni adhesión de membranas. Se advierte que, aunque todas las estructuras son positivas a la sonda, hay una población nuclear compleja donde coexisten los núcleos de los distintos tipos celulares de la retina, de distinto tamaño y con diferente grado de compactación del ADN.

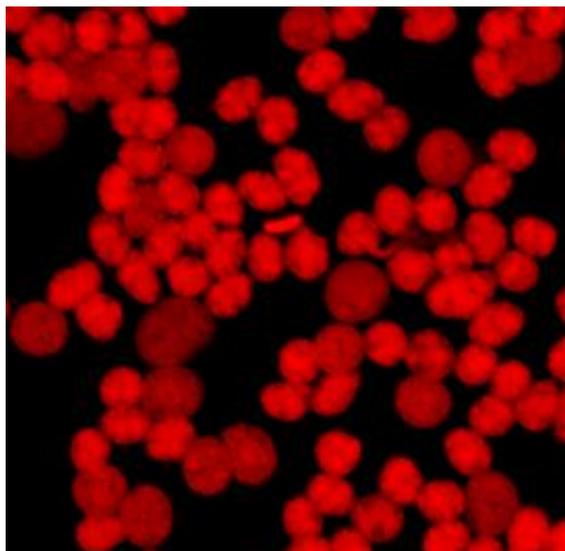


Figura 1. Análisis de la pureza de la FNR mediante la tinción con la sonda nuclear Ioduro de Propidio. Se realizó una tinción de la FNR con la sonda nuclear Ioduro de Propidio, como fue descrito en materiales y métodos. La siguiente, es una imagen representativa obtenida por microscopía de fluorescencia.

1.1.2 Determinación de la presencia de la DAGK ζ en los núcleos de la retina bovina.

La diacilglicerol quinasa (DAGK) cataliza la reacción de formación de PA mediante la fosforilación del hidroxilo libre de 1,2 diacilglicerol, utilizando ATP como cosustrato de la reacción enzimática.

Los datos bibliográficos reportaron que la DAGK ζ se localiza en los núcleos de distintos tipos celulares. Esta isoforma presenta una secuencia de localización nuclear, NLS, la cual puede ser fosforilada por las PKC de tipo convencional y esto facilita su exportación nuclear (Goto y col., 2006; Topham y col., 1998). En función de estos resultados, nuestro primer objetivo fue detectar la presencia de la DAGK ζ en los núcleos de la retina bovina.

Se llevó a cabo el aislamiento de los núcleos de la retina bovina como fue detallado en 2.2.1 y se emplearon los anticuerpos correspondientes para detectar a la isoforma en estudio por inmunofluorescencia en la fracción nuclear de la retina (FNR) (Figura 2).

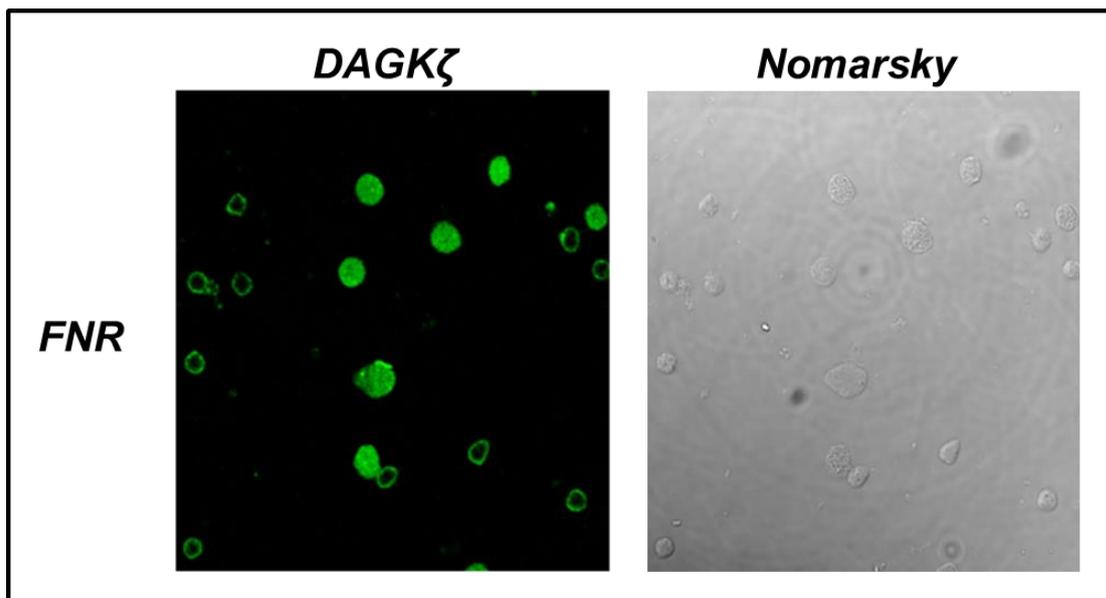


Figura 2. Análisis de la presencia de la DAGK ζ en la fracción nuclear de la retina. La FNR fue obtenida por aplicación del “método tradicional”. Una alícuota de la suspensión nuclear de la FNR fue tratada e incubada con el anticuerpo primario de conejo anti-DAGK ζ (1: 100; v/v) en BSA 5 %, toda la noche a 4 °C y con el anticuerpo secundario anti-conejo unido a FITC (1: 200, v/v) en BSA 5 %, durante 2 hs a temperatura ambiente. Luego, la muestra fue analizada por microscopía confocal como fue detallado en materiales y métodos.

En la imagen obtenida por microscopía confocal de fluorescencia se pudo observar que la DAGK ζ está presente en los núcleos de la retina bovina, y que su localización intranuclear es dependiente del tipo celular del cual provienen los núcleos. En base a las observaciones de las imágenes de inmunohistoquímica de la retina de mamíferos, incluyendo las observaciones de los cortes de la retina de rata realizados en nuestro laboratorio, se puede inferir que los más pequeños son los núcleos de los fotorreceptores (presentes en la capa nuclear externa) y los de mayor tamaño corresponden a otros tipos celulares (células amacrinas, bipolares, ganglionares, etc.). Los resultados correspondientes a la Figura 2 sugieren que la DAGK ζ , presente en los núcleos de la retina bovina, se localiza en la periferia de los núcleos de las células fotorreceptoras, de menor tamaño, mientras que se ubica homogéneamente en la matriz y en la envoltura nuclear de los núcleos de los demás tipos celulares de la retina (de mayor tamaño que los anteriores).

1.1.3 Análisis de la actividad enzimática de la DAGKζ en los núcleos de la retina bovina.

Las imágenes obtenidas por microscopía confocal de fluorescencia presentadas en la Figura 2, demostraron la presencia de la DAGKζ en los núcleos de la retina bovina. A continuación, nos propusimos analizar su actividad enzimática.

Las DAGK son enzimas bisustrato, esto significa que para llevar a cabo su actividad requieren de DAG (sustrato de la reacción enzimática) y ATP (cosustrato de la reacción enzimática). Esta característica nos permitió utilizar dos herramientas experimentales para la medición de su actividad basadas en el empleo de uno u otro sustrato radiomarcado. Se puede emplear DAG- ^3H , o ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$, obteniéndose PA- ^3H o PA- ^{32}P como productos de la reacción enzimática, respectivamente.

Para determinar la actividad enzimática de la DAGKζ en los núcleos de la retina bovina se utilizó DAG- ^3H como sustrato de la reacción enzimática. Este fue obtenido por incubación de las retinas bovinas con glicerol- $[2\text{-}^3\text{H}]$, como resultado de la síntesis *de novo* de lípidos, como fue detallado en 4.1.1 de materiales y métodos. Para definir las condiciones que nos permitieran favorecer la medida de la actividad DAGKζ utilizamos datos de la bibliografía.

En los ensayos enzimáticos en los que se analiza la actividad de enzimas cuyos sustratos son de carácter lipofílico o que generan productos lipofílicos, como es el caso de las DAGK, se suelen emplear micelas mixtas de lípido-detergente para solubilizar los sustratos o los productos de la reacción enzimática. Además, en el caso de las DAGK, se ha demostrado la dependencia de su actividad por fosfolípidos y detergentes (Epanand y col., 2007; Fanani y col., 2004). Los resultados obtenidos por Thirugnanam y colaboradores reportaron que la fosfatidilserina y otros lípidos aniónicos inhiben fuertemente la actividad de la DAGKε a la vez que incrementan la actividad de la DAGKζ (Thirugnanam y col., 2001). Teniendo en cuenta estos datos bibliográficos, para medir selectivamente la actividad DAGKζ en la FNR, se realizó un

ensayo enzimático empleando DAG- ^3H y ATP (no radioactivo) como sustratos, Tritón x-100 15 mM, un detergente no iónico que favorece la actividad de la isoforma en estudio, 1,2-dioleoilfosfatidilserina (DOPS), fosfolípido aniónico que estimula la actividad de DAGK ζ a la vez que inhibe la actividad de DAGK ϵ , y R59022, inhibidor selectivo de DAGK de tipo I.

Las condiciones experimentales fueron las siguientes:

- Condición *T*, en presencia de Tritón X-100.
- Condición *TPS*, empleando Tritón X-100 y DOPS en el ensayo enzimático.
- Condición *TR*, en presencia de Tritón X-100 y R59022.
- Condición *TPSR*, utilizando Tritón X-100, DOPS y R59022.

Esta última (*TPSR*) se considera la condición ideal para analizar específicamente a la actividad de la DAGK ζ .

El ensayo enzimático fue diseñado de manera tal que en varias condiciones experimentales estuvieron ausentes algunos de los compuestos antes mencionados para deducir el aporte de otras isoformas DAGK a la actividad nuclear medida.

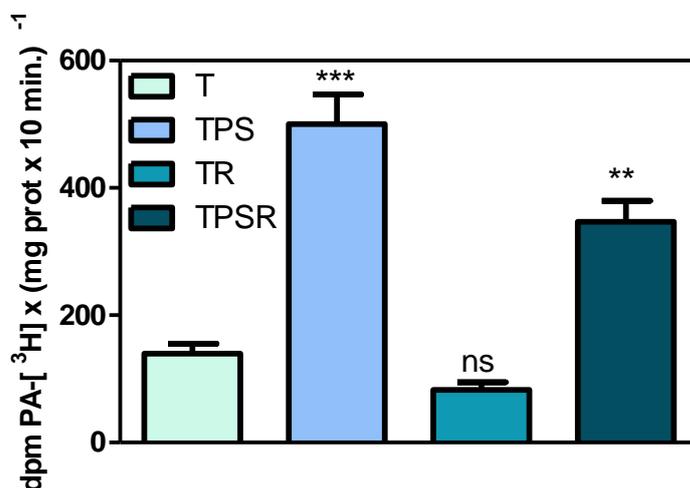


Figura 3. Análisis de la actividad DAGK en la FNR. Empleo de condiciones para medir selectivamente la actividad de la DAGK ζ : Las proteínas de la FNR (100 μg) fueron preincubadas con DOPS 4 mM, R59022 10 μM o sus vehículos durante 10 min a 37 $^{\circ}\text{C}$ y luego fueron incubadas con DAG- ^3H , en presencia de Tritón x-100 15 mM y ATP 250 μM durante 10 min a 37 $^{\circ}\text{C}$. Los resultados se expresan como dpm PA- ^3H) x (mg prot x 10 min.)⁻¹. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$.

Tal como se puede observar en la Figura 3, el DAG fue transformado en PA en los núcleos de la retina bovina, en presencia de Tritón X-100. La incorporación de DOPS al ensayo enzimático, fosfolípido que ha demostrado ser activador de la DAGK ζ e inhibidor de la isoforma ϵ , produjo un fuerte estímulo de la actividad DAGK (260 %) con respecto al control (T). Cuando R59022 (inhibidor de las DAGK de tipo I) fue empleado, se produjo una disminución de la formación de PA (40 %) con respecto a la condición control (T). En presencia de DOPS y R59022, la actividad DAGK disminuyó significativamente (30 %) con respecto a su control (TPS). Los resultados sugieren que en los núcleos de la retina bovina (FNR) y en las condiciones de ensayo mencionadas, aunque la mayor parte de la formación de PA parece ser debida a la actividad de la DAGK ζ , se ha medido además una actividad correspondiente a las isoformas DAGK de tipo I (que representa un 35 % de la transformación del DAG).

1.1.4 Acción de Insulina sobre la actividad enzimática DAGK en los núcleos de la retina bovina.

La insulina y el factor de crecimiento similar a insulina (IGF-1) cumplen importantes funciones en el SNC y en la retina. Resultados previos de nuestro grupo de investigación demostraron que la insulina es capaz de regular la actividad DAGK en los sinaptosomas de hipocampo y de la corteza cerebral (Zulian y col., 2006). Otros autores reportaron, además, que tanto la insulina como el IGF-1 cumplen un rol fundamental en la supervivencia de los bastones y conos de la retina (Rajala y col., 2008; Rajala y col., 2013). En función de estos hallazgos, nuestro siguiente objetivo fue analizar los efectos de la exposición de las retinas bovinas a la insulina sobre la actividad DAGK en la FNR.

Para ello, la mitad de las copas de un grupo de ojos bovinos fue preincubada con insulina (previamente disuelta en el medio Ames junto a vanadato), mientras que la mitad restante fue incubada con medio Ames (condición control, en ausencia de

insulina y vanadato) y luego se realizó el procedimiento de aislamiento de los núcleos de la retina como se explicó en 2.2.1 de la sección de materiales y métodos. En el ensayo enzimático fueron utilizados DAG- ^3H y ATP (no radioactivo) como sustratos, en presencia o ausencia de PS para ambos casos. Teniendo en cuenta el resultado anterior (Figura 3) que demostró el aporte de una o más isoformas de tipo I a la actividad DAGK nuclear, el ensayo enzimático fue realizado en ausencia del inhibidor R59022 con el fin de no excluir a las isoformas del tipo I.

Las condiciones evaluadas fueron las siguientes:

- Condición *T*, en presencia Tritón X-100.
- Condición *TPS*, en la cual los núcleos provenientes de las retinas control (preincubadas con medio Ames) fueron incubados con Tritón X-100 y PS.
- Condición *TIV*, en que los núcleos provenientes de las retinas preincubadas con insulina y vanadato, fueron incubados en presencia de Tritón X-100.
- Condición *TPSIV*, en la cual los núcleos provenientes de las retinas preincubadas con insulina y vanadato, fueron incubados en presencia de Tritón X-100 y fosfatidilserina.

Este diseño experimental nos permitió analizar los efectos de la insulina sobre la actividad DAGK nuclear (por comparación de la condición *T* (control) respecto de *TIV*, y de *TPS* respecto de *TPSIV*). Además, nos permitió determinar los efectos de una fosfatidilserina de composición compleja, obtenida a partir de un extracto lipídico de retina, sobre la formación de PA nuclear (comparando la condición *T* con respecto a la condición *TPS*, y la condición *TIV* con respecto a la condición *TPSIV*).

Los resultados obtenidos (Figura 4) demostraron que la exposición de las retinas bovinas a la insulina indujo un estímulo de un 29 % en la actividad DAGK presente en los núcleos de la retina bovina. Sin embargo, a diferencia del resultado anterior (Figura 3), no se observaron diferencias en la actividad DAGK nuclear cuando el ensayo enzimático fue realizado en presencia o ausencia de fosfatidilserina de composición compleja. Esta diferencia entre los resultados obtenidos en ambos ensayos (Figura 3 y

Figura 4) puede deberse a que en el primer caso se utilizó una 1,2-dioleoilfosfatidilserina (DOPS), mientras que en el último caso se empleó una PS obtenida a partir de un extracto lipídico de retina. Este fosfolípido de retina posee una composición compleja, enriquecida fundamentalmente en ácidos grasos poliinsaturados como el ácido docosahexaenoico (22: 6). Si bien se ha descrito que la DOPS y el PIP₂, en calidad de fosfolípidos ácidos, son activadores de la DAGK ζ (Thirugnanam y col., 2001), también se ha reportado que la unión y la actividad de esta enzima es favorecida con los lípidos que generan fases invertidas, tales como la DOPE (Fanani y col., 2004). Nuestro hallazgo respecto a la ausencia de efecto de una PS de composición natural apoyaría la hipótesis de que la activación por DOPS depende más de ambiente hidrofóbico que de la polaridad del fosfolípido. Este hallazgo nos permite sugerir que la PS, que es activadora de la DAGK ζ y que, por consiguiente, produjo un estímulo de la actividad DAGK detectada en FNR, sería una PS de composición de acilos específica.

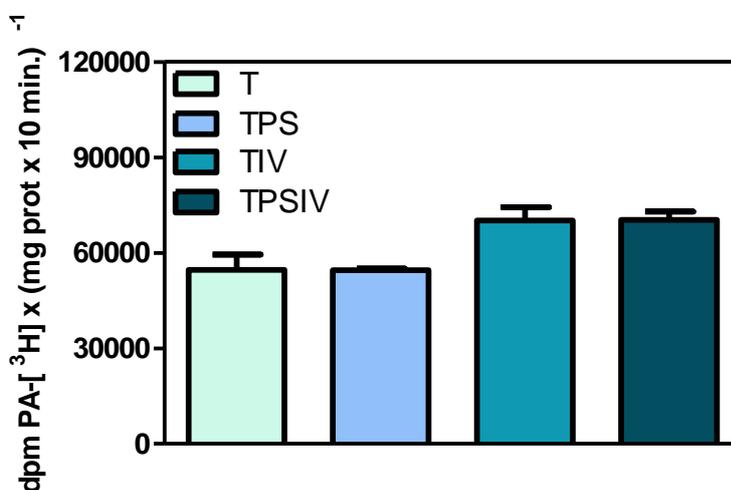


Figura 4. Efectos de la insulina y de la fosfatidilserina sobre la actividad DAGK en la fracción nuclear de la retina (FNR). Las copas de los ojos bovinos fueron preincubadas con insulina 0,2 μ M y vanadato 0,2 mM disueltos en medio Ames, o con medio Ames únicamente (condición control), durante 15 min. El protocolo de aislamiento de los núcleos de la FNR se llevó a cabo como fue descrito en la sección de materiales y métodos. La actividad DAGK fue medida usando 100 μ g de proteínas de la FNR, DAG-[³H] 13 μ M y ATP 250 μ M como sustratos, en presencia de PS o su vehículo, como fue detallado en materiales y métodos. Los resultados se expresan como dpm PA-[³H] x (mg prot x 10 min.)⁻¹. Las diferencias halladas no fueron estadísticamente significativas.

Ambas experiencias (Figuras 3 y 4) demostraron que fue detectada una actividad enzimática DAGK en los núcleos de la retina bovina (FNR). Los resultados sugieren que existirían al menos dos isoformas DAGK en la fracción nuclear de la retina y que una de ellas sería la DAGK ζ y la/s otra/s sería/n inhibible/s por R59022). También observamos que la exposición de la retina entera a la insulina aumenta la actividad enzimática DAGK nuclear.

Tal como se evidencia en las Figuras 1 y 2, la FNR es una fracción compleja, donde coexisten los núcleos de los distintos tipos celulares, entre los cuales se encuentran los núcleos de las células fotorreceptoras, donde pudimos demostrar la presencia de la DAGK ζ . El siguiente objetivo entonces, dado el interés en evaluar el efecto de la luz y de la insulina, fue obtener una fracción enriquecida en los núcleos de los fotorreceptores.

1.2 ESTUDIO DE LAS DAGK EN LOS NÚCLEOS DE LAS CÉLULAS FOTORRECEPTORAS DE LA RETINA BOVINA (FNF). EFECTOS DE LA LUZ SOBRE DISTINTAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN LA FNF.

1.2.1 Análisis comparativo de las fracciones nucleares obtenidas por el “método tradicional” y el “método nuevo”.

Los estudios de inmunohistoquímica de nuestro grupo de investigación revelaron que la DAGK ϵ presenta una localización dependiente de la luz. En estos estudios, realizados en retina de rata se describió que en la oscuridad la isoforma se encuentra en el segmento interno de las células fotorreceptoras y que por la acción de la luz se enriquece en los segmentos externos (Natalini y col., 2013). Estos hallazgos revelaron una inmunotinción positiva a DAGK ϵ en la capa nuclear externa (que comprende a los núcleos pequeños de las células fotorreceptoras) en oscuridad, la cual se vio modificada por acción de la luz.

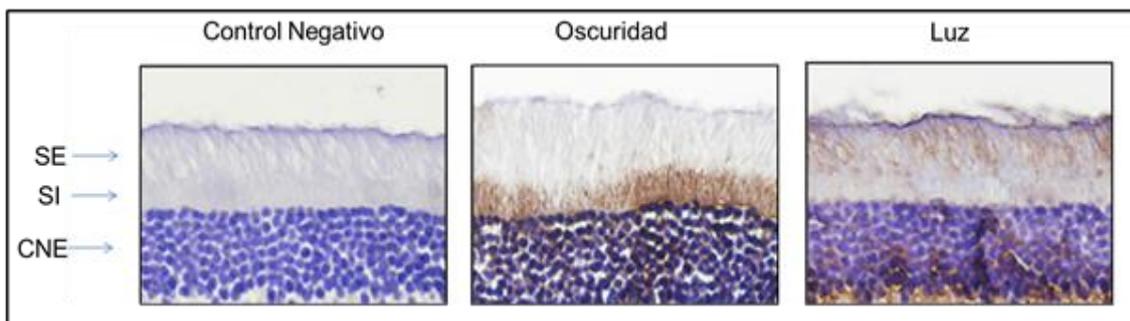


Figura 5. Localización de la DAGK ϵ en las células fotorreceptoras de la retina de ratas adaptadas a la oscuridad o expuestas a la luz por IHQ. La inmunotinción fue detectada usando el anticuerpo primario de conejo anti- DAGK ϵ (1: 100, v/v) y el anticuerpo secundario biotinilado anti-conejo IgG (1: 400, v/v). El control negativo se realizó omitiendo el anticuerpo primario. SE: Segmento externo de los bastones de la retina; SI: segmento interno de bastones de la retina; CNE: Capa nuclear externa.

Con el fin de explorar la presencia de las DAGK y su actividad en los núcleos de los fotorreceptores, así como su eventual modulación por acción de la luz, nuestro primer objetivo fue aislar una fracción nuclear enriquecida en los núcleos de las células fotorreceptoras de la retina bovina.

Los núcleos de los diferentes tipos celulares de la retina bovina presentan importantes diferencias de tamaño, siendo los núcleos de las células fotorreceptoras más pequeños que los núcleos correspondientes a los demás tipos celulares de la retina. Teniendo en cuenta estas diferencias de tamaño, se realizó una modificación al protocolo tradicionalmente utilizado para el aislamiento de núcleos de cerebelo, descrito por Gaveglio (Gaveglio y col., 2011), y utilizado en las primeras experiencias presentadas en esta tesis doctoral para aislar los núcleos de la retina bovina. La modificación consistió en la adición de una capa de sacarosa de mayor densidad al gradiente de sacarosa del “método tradicional” (2,3 M-1,6 M), (Materiales y métodos, 2.2.2). Esta modificación al protocolo inicial (“método tradicional”), se basó en la hipótesis de que solo los núcleos más pequeños (y más densos) serían capaces de atravesar una capa de sacarosa de mayor densidad (2,4 M) al efectuar una centrifugación diferencial a una velocidad y tiempo similar.

Es conocido que la proporción de los bastones en la retina de los mamíferos es muy superior a la proporción de los demás tipos celulares (Jeon y col., 1998). Si bien nuestras observaciones por microscopía confocal de fluorescencia (Figura 1) demostraron que la fracción nuclear obtenida por el “método tradicional” presentaba un alto porcentaje de núcleos de células fotorreceptoras, el fin de nuestra propuesta fue lograr una población nuclear que mejorara el porcentaje de los núcleos de las células fotorreceptoras, para evaluar los efectos de la luz en los núcleos de las células donde se lleva a cabo el proceso de la fototransducción.

Con la finalidad de comparar el porcentaje de los núcleos de las células fotorreceptoras obtenido por ambos protocolos, las fracciones nucleares fueron analizadas empleando las siguientes técnicas: a) Tinción nuclear con la sonda fluorescente yoduro de Propidio, b) Microscopía electrónica de transferencia, y c) *Western Blot*.

En primer lugar se realizó una tinción con la sonda nuclear yoduro de propidio (Materiales y métodos, 2.2.3.1). Las dos características analizadas en las imágenes fueron el tamaño de los núcleos y la distribución de la cromatina. Como se explicó anteriormente, el tamaño nuclear es una característica de gran utilidad en este caso, dado que el tamaño de los núcleos de las células fotorreceptoras es menor que el de los núcleos de los demás tipos celulares de la retina. En cuanto a la segunda característica tenida en cuenta para efectuar la comparación, se ha reportado que en el caso particular de los bovinos, los núcleos de las células fotorreceptoras presentan una distribución cromatínica lobulada en “rueda de carro” (Solovei y col., 2009), mientras que en el resto de los tipos celulares de la retina bovina, los núcleos presentan una distribución cromatínica homogénea. Por lo tanto, esta constituye una herramienta fundamental para identificar a los núcleos de las células fotorreceptoras en las poblaciones nucleares obtenidas por ambas metodologías.

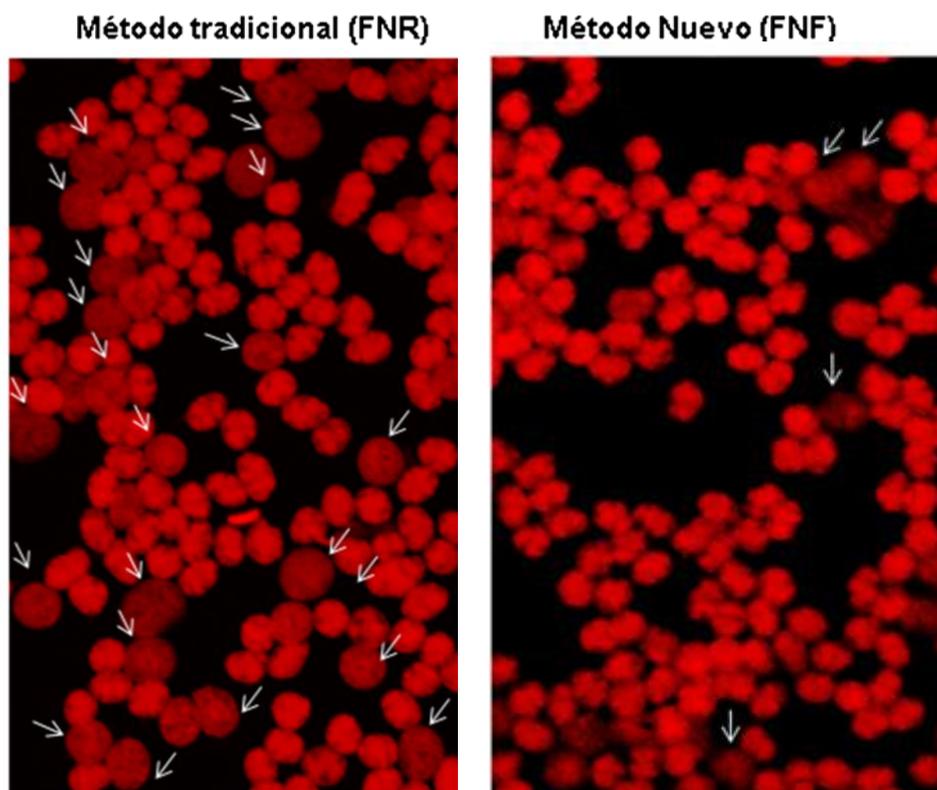


Figura 6. Análisis comparativo de la FNR y la FNF por tinción con la sonda nuclear ioduro de propidio. La FNR y la FNF fueron obtenidas por aplicación del “método tradicional” y el “método nuevo” respectivamente, como fue descrito en materiales y métodos. Las suspensiones nucleares fueron tratadas e incubadas con la sonda nuclear fluorescente ioduro de propidio, y las muestras fueron analizadas por microscopía de fluorescencia.

En las imágenes de la Figura 6 se pudo observar que la población nuclear obtenida por aplicación del “método nuevo” (denominada fracción nuclear de las células fotorreceptoras, FNF) presenta una alta proporción de núcleos cuyas características se corresponden con las de los núcleos de células fotorreceptoras, es decir, presentan un tamaño pequeño y una distribución cromatínica lobular en “rueda de carro”, mientras que cuando se utilizó el “método tradicional” para aislar a los núcleos de la retina, se obtuvo una fracción nuclear compleja (denominada fracción nuclear de la retina, FNR), constituida por varios tipos nucleares, de distintos tamaños y distribución cromatínica. En ambas imágenes correspondientes a la Figura 6, los núcleos de las células “no fotorreceptoras” fueron señalados con flechas blancas. Se puede observar claramente que con el “método tradicional” se obtuvo una alta proporción de núcleos “no fotorreceptores” en comparación con el “método nuevo”.

En la siguiente tabla se muestran los resultados correspondientes a la cuantificación del porcentaje de núcleos de células fotorreceptoras respecto de los demás tipos celulares, obtenidos por ambos protocolos. Esta cuantificación es representativa de las imágenes de varios campos obtenidos por microscopía confocal.

	<i>Método Tradicional</i>	<i>Método Nuevo</i>
<i>Núcleos fotorreceptores (FNF)</i>	197	177
<i>Núcleos de otros tipos celulares</i>	23	3
<i>Núcleos totales</i>	220	180
<i>Porcentaje FNF/núcleos totales</i>	89.5 %	98.5 %

Tabla 1. Determinación del porcentaje de los núcleos de las células fotorreceptoras en la FNR y en la FNF. Se realizó la cuantificación de los núcleos de las células fotorreceptoras respecto de los núcleos totales, en una cantidad significativa de campos observados por microscopía confocal.

El análisis de los datos mostrados en la tabla 1 demuestra que el “método nuevo” permitió obtener una fracción prácticamente total de los núcleos de las células fotorreceptoras (98.5 %), mientras que el porcentaje de los núcleos de las células fotorreceptoras obtenido por el “método tradicional”, si bien fue elevado (89.5 %), fue notablemente inferior al anterior. Sin embargo, se debe destacar que el rendimiento obtenido por aplicación del “método nuevo” disminuyó sensiblemente respecto al “método tradicional”.

A continuación se analizaron ambas fracciones nucleares por microscopía electrónica de transferencia (MET) (Figura 7). Los resultados de MET también mostraron una notable mejoría en la obtención de los núcleos de las células fotorreceptoras cuando fue utilizado el “método nuevo”. En la imagen representativa de la fracción nuclear obtenida por empleo del “método tradicional”, se pudieron observar varios tipos nucleares, cuyas diferencias en forma, tamaño y distribución cromatínica son evidentes. Sin embargo, en la imagen que representa a la fracción nuclear obtenida

por la aplicación del “método nuevo” se observó la presencia de un único tipo nuclear, cuyas características son coincidentes con las descritas para los núcleos de las células fotorreceptoras. Los núcleos “no fotorreceptores” observados en la imagen representativa de la fracción nuclear obtenida por el “método tradicional” fueron indicados con flechas negras.

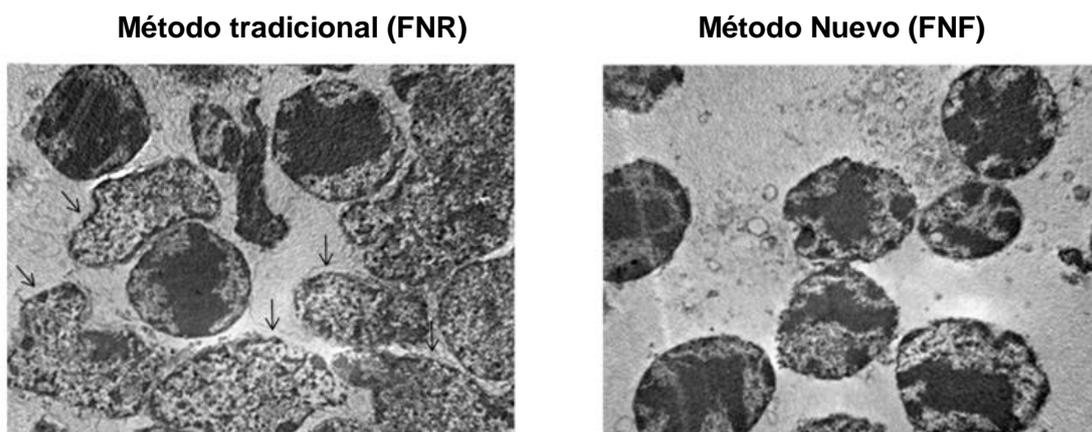


Figura 7. Imágenes de MET representativas de las fracciones nucleares obtenidas por aplicación del “método tradicional” o el “método nuevo”. Las imágenes fueron adquiridas con un aumento de 8000 X.

El grado de enriquecimiento en núcleos de células fotorreceptoras fue además comparado en ambas fracciones nucleares por *Western Blot* (WB). Para ello, se analizó el contenido de CRX, un factor de transcripción específico de las células fotorreceptoras (Furukawa y col., 1997), utilizando como control de carga a LAP-2 β , una proteína constitutiva de los núcleos que, en consecuencia, es considerada un marcador nuclear de gran utilidad.

En la Figura 8 se puede observar un aumento de un 100 % en el contenido relativo de CRX/LAP-2 β en la fracción nuclear obtenida por empleo del “método nuevo” (FNF) respecto de aquella obtenida por aplicación del “método tradicional” (FNR). Este enriquecimiento es posible ya que la metodología permite seleccionar a los núcleos de menor tamaño. Sin embargo, debemos aclarar que no se recupera la totalidad de los núcleos de las células fotorreceptoras ya que el contenido de la FNF (en mg de

proteínas) es un 50 % menor que el de la FNR. Dado que nuestra finalidad era obtener una población enriquecida en los núcleos de las células fotorreceptoras, el menor rendimiento del procedimiento es aceptable para nuestros objetivos.

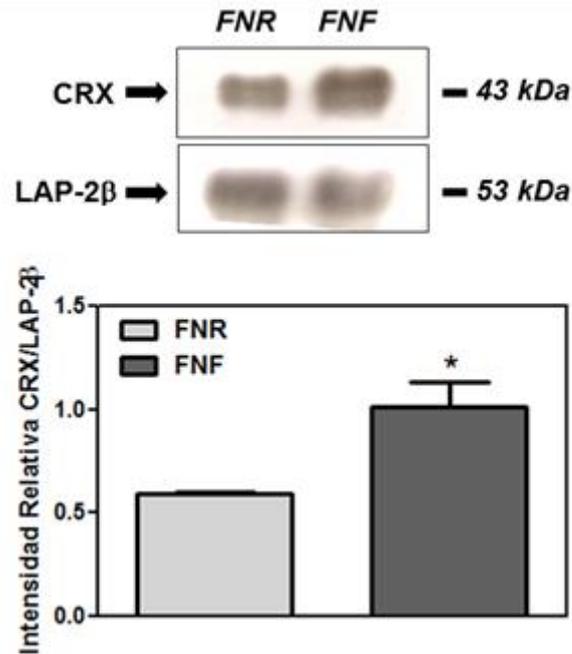


Figura 8. Determinación del contenido de CRX (factor de transcripción específico de las células fotorreceptoras) en la FNR y en la FNF por WB. Las proteínas de la FNR y la FNF (40 µg) se resolvieron por SDS-PAGE al 10 % y se transfirieron a una membrana de PVDF. (A) Detección de CRX: anticuerpo primario (policlonal de conejo, dilución 1: 1.000, v/v) 2 h a temperatura ambiente, anticuerpo secundario anti-conejo (1: 2.000, v/v), 2 h a temperatura ambiente. * $p < 0,05$.

Es interesante destacar que la aplicación de estas metodologías también permitió evidenciar la pureza de ambas fracciones nucleares (FNF y FNR). En las imágenes representativas obtenidas por microscopía confocal (en donde las imágenes de inmunofluorescencia fueron comparadas con sus correspondientes imágenes de Nomarski), así como también en las imágenes obtenidas por MET se advierte que es muy escaso el contenido de vesículas membranosas de menor tamaño.

Para descartar la presencia de otras organelas subcelulares en la FNF, se determinó el contenido de calnexina (marcador de retículo endoplasmático) y rodopsina (marcador de los segmentos externos de las células fotorreceptoras) en la FNF y en el homogenado de la retina bovina (control positivo) por WB.

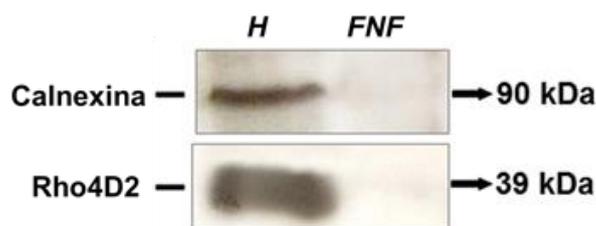


Figura 9. Determinación de la pureza de la FNF por WB. Las proteínas del homogenado de la retina y de la FNF (40 μ g) se resolvieron por SDS-PAGE al 10 % y se transfirieron a una membrana de PVDF. Detección de calnexina (proteína marcadora de retículo endoplasmático): anticuerpo primario (policlonal de conejo, dilución 1: 1.000, v/v), 2 h a temperatura ambiente, anticuerpo secundario anti-conejo (1: 2.000, v/v), 2 h a temperatura ambiente. Detección de rodopsina (Rho4D2) (proteína marcadora de los segmentos externos de las células fotorreceptoras): anticuerpo primario (monoclonal de ratón, dilución 1: 1.000, v/v), toda la noche a 4 °C, anticuerpo secundario anti-ratón (1: 2.000, v/v), 2 h a temperatura ambiente.

El resultado indica la ausencia de ambos marcadores de otras organelas subcelulares en la fracción nuclear de las células fotorreceptoras.

En conclusión, los resultados comparativos de ambos protocolos demostraron que la fracción nuclear obtenida por el “método nuevo” (FNF) no solo es pura, sino que además está significativamente enriquecida en los núcleos de las células fotorreceptoras con respecto a la fracción nuclear obtenida por el “método tradicional” (FNR).

1.2.2 Caracterización de la actividad DAGK en la fracción nuclear de las células fotorreceptoras.

Con el fin de determinar la presencia de las DAGK en la FNF, se analizó su actividad bajo distintas condiciones de ensayo.

Es conocida la preferencia de ciertas isoformas de DAGK por sustratos lipídicos de composición específica. Mientras que la DAGK ϵ (clase III) presenta preferencia por los diacilglicéridos que contienen araquidonato en la posición 2, como el 1-estearoil, 2-araquidonoil-glicerol (SAG), la DAGK ζ (clase IV) utiliza con mayor avidez el 1,2-dioleoilglicerol (DOG). Por su parte, las DAGK de tipo I no presentan preferencia de

sustrato, transformando a los DAG de composición más o menos saturada de igual modo (Thirugnanam y col., 2001).

Los ensayos enzimáticos se llevaron a cabo empleando ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ como sustrato radiomarcado y DAG endógeno o DAG exógenos de distinta composición en ácidos grasos, tales como DOG o SAG (Figura 10).

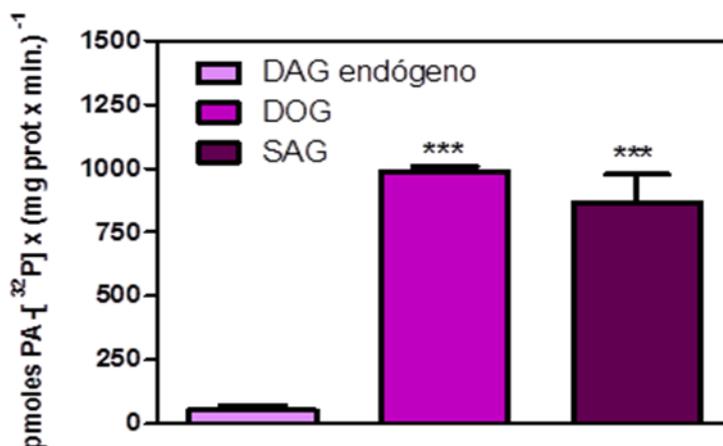


Figura 10. Transformación de DAG de distinta composición de ácidos grasos en la FNF de la retina bovina. Se determinó la actividad DAGK empleando ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ como sustrato radiomarcado (3 μCi por muestra) y DAG endógeno o DAG exógenos de distinta composición en ácidos grasos, tales como 1,2-dioleoilglicerol (DOG) o 1-estearoil, 2-araquidonoil-glicerol (SAG) (500 μM). La reacción se inició con el agregado de la suspensión de las membranas nucleares (100 μg) la cual fue incubada durante 10 min a 37 $^{\circ}\text{C}$, previa sonicación durante 15 segundos a fin de introducir el ATP a los núcleos. Los resultados fueron expresados como pmoles PA- $[\text{}^{32}\text{P}]$ x (mg prot x min.) $^{-1}$. *** $p < 0,001$.

En la Figura 10 se ilustran los niveles de formación de PA a partir de DAG endógeno, o de sustratos exógenos (DOG o SAG) en la FNF.

Estos resultados demostraron actividad DAGK en los núcleos de las células fotorreceptoras de la retina bovina. La formación de PA se incrementó significativamente en presencia de los sustratos exógenos DOG y SAG. La capacidad de transformación de DOG y SAG (muy similar) en la FNF indicaría que no solo está presente la DAGK ζ sino que además es probable que esté presente la DAGK ϵ . Tampoco es posible descartar la presencia de las isoformas de tipo I, quienes utilizan ambos sustratos con la misma eficiencia.

1.2.2.1 Estudio cinético de la actividad DAGK en la FNF.

Para determinar las condiciones ideales para medir la actividad DAGK en la FNF, se llevaron a cabo estudios de cinética enzimática midiendo la actividad de la enzima en función del tiempo de ensayo, de la concentración de proteínas nucleares, de la concentración de ATP y de la concentración de DAG.

1.2.2.1.1 Determinación de la actividad DAGK en la FNF en función del tiempo de ensayo.

En el ensayo enzimático realizado para medir la actividad DAGK a distintos tiempos de incubación se utilizó ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ como sustrato radiomarcado, ATP 250 μM y DOG 500 μM . Se determinó la actividad de la enzima a distintos tiempos de incubación, como se muestra en la Figura 11.

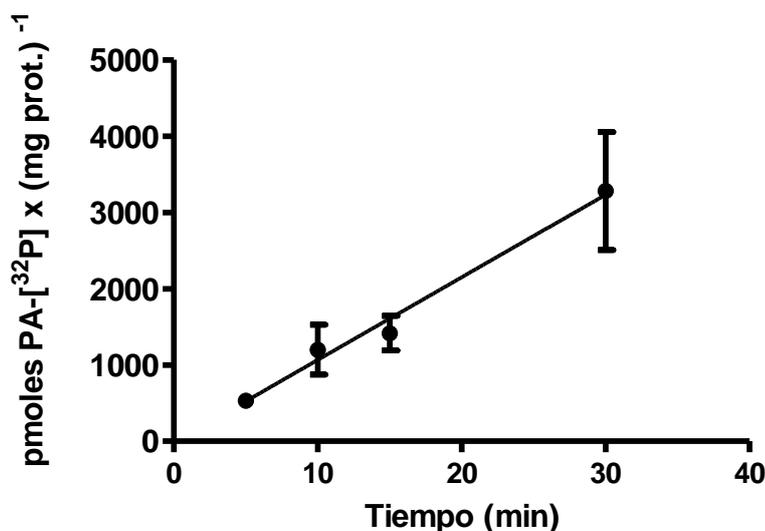


Figura 11. Actividad DAGK nuclear en función del tiempo de incubación. Los núcleos de la FNF (100 μg de proteínas) fueron incubados en presencia de ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ como sustrato radiomarcado, ATP 250 μM y DOG 500 μM . La reacción enzimática se inició con el agregado de la suspensión de las membranas nucleares y fue frenada con C: M (2:1, v/v) al cabo de 5, 10, 15 y 30 min (tiempos de ensayo analizados).. Los resultados fueron expresados como pmoles PA- $[\text{}^{32}\text{P}] \times (\text{mg prot.})^{-1}$.

Entre los 5 min y los 30 min de ensayo, y empleando condiciones que aseguran la presencia de concentraciones suficientes de ambos sustratos, se observó una respuesta lineal de la actividad DAGK en la FNF.

I.2.2.1.2 Determinación de la actividad DAGK en función de la concentración de las proteínas nucleares utilizadas en el ensayo enzimático.

Al igual que en el caso anterior, el ensayo enzimático para determinar la actividad DAGK en función de la concentración de proteínas nucleares fue realizado en presencia de ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$, ATP 250 μM y DOG 500 μM como sustratos.

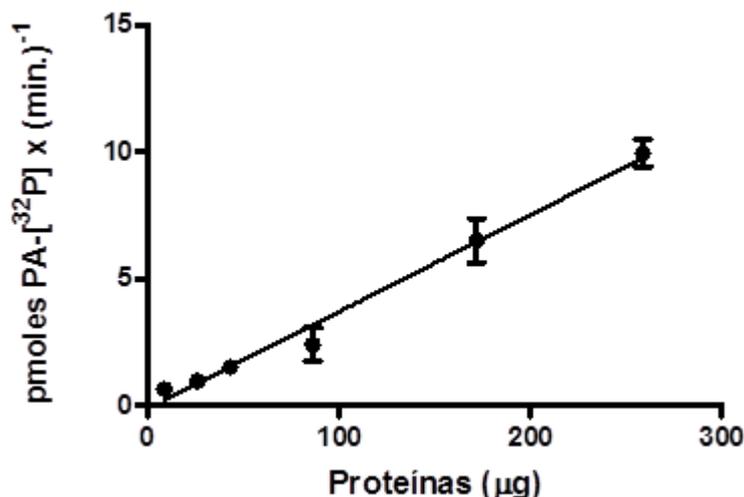


Figura 12. Determinación de la actividad DAGK en la FNF en función de la concentración de las proteínas nucleares. Concentraciones crecientes de FNF fueron incubadas con ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ como sustrato radiomarcado (3 μCi por ensayo), ATP 250 μM y DOG 500 μM . La reacción enzimática se inició con el agregado de la suspensión de las membranas nucleares, la cuál fue incubada durante 10 min a 37 $^{\circ}\text{C}$. Las distintas condiciones fueron ensayadas por triplicado. Los resultados fueron expresados como pmoles PA- $[\text{}^{32}\text{P}] \times (\text{min.})^{-1}$.

Tal como se observa en la Figura 12, bajo condiciones que aseguraron concentraciones suficientes de ambos sustratos, se obtuvo una respuesta lineal cuando la actividad DAGK fue medida utilizando entre 10 y 250 μg de proteínas (siendo 250 μg la máxima concentración de proteínas nucleares analizada).

I.2.2.1.3. Dependencia de la actividad DAGK con la concentración de ATP.

Para evaluar las características cinéticas de la reacción enzimática, se determinó la concentración saturante de ATP sobre la DAGK. El ensayo enzimático fue realizado utilizando distintas concentraciones de ATP no radiomarcado hasta alcanzar una

concentración máxima de 4 mM, ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ como sustrato radiomarcado y DOG como sustrato lipídico, cuya concentración (500 μM) se mantuvo constante en el ensayo. La Figura 13 muestra que la velocidad de reacción sigue una cinética de Michaelis-Menten.

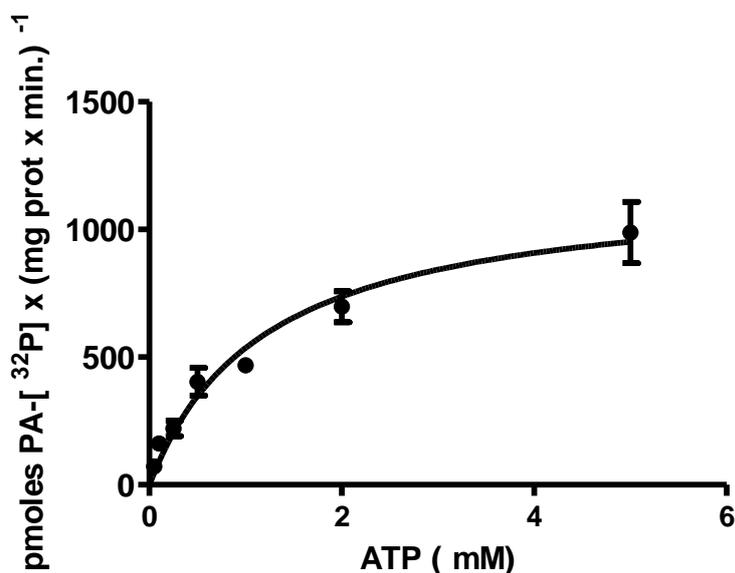


Figura 13. Determinación de la actividad DAGK en función de la concentración de ATP en la FNF. Se utilizó DOG 500 μM como sustrato lipídico y concentraciones crecientes de ATP hasta una concentración máxima de 4 mM, utilizando ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ como precursor radioactivo a razón de 3 μCi por muestra para aquellas condiciones en que la concentración de ATP fue de hasta 200 μM y 6 μCi , para concentraciones superiores de ATP. La reacción se inició con el agregado de la suspensión de la FNF durante 10 min de reacción a 37 $^{\circ}\text{C}$. Las distintas condiciones fueron ensayadas por triplicado. Los resultados fueron expresados como pmoles PA- $[\text{}^{32}\text{P}] \times (\text{mg prot} \times \text{min.})^{-1}$.

En la Figura 13 se puede observar que la síntesis de PA aumentó en función de la concentración de ATP, alcanzándose la saturación de la enzima a una concentración de ATP 4 mM bajo las condiciones experimentales utilizadas.

La expresión de las inversas ($1/v$ en función de $1/[\text{ATP}]$), método de Lineweaver Burk, nos permitió la linealización y con ello la posibilidad de realizar la regresión lineal de los resultados. Aunque el sistema es muy complejo, ya que la enzima no se encuentra purificada bajo las condiciones experimentales de trabajo, sino que se mide la actividad enzimática presente en una suspensión membranosa donde además puede haber varias isoformas, hemos calculado los valores de K_m y V_{max} "aparentes" para

el sustrato ATP en presencia de una concentración saturante de cosustrato (DOG 500 μM). Se obtuvo un K_m^{ATP} de 0,484 mM.

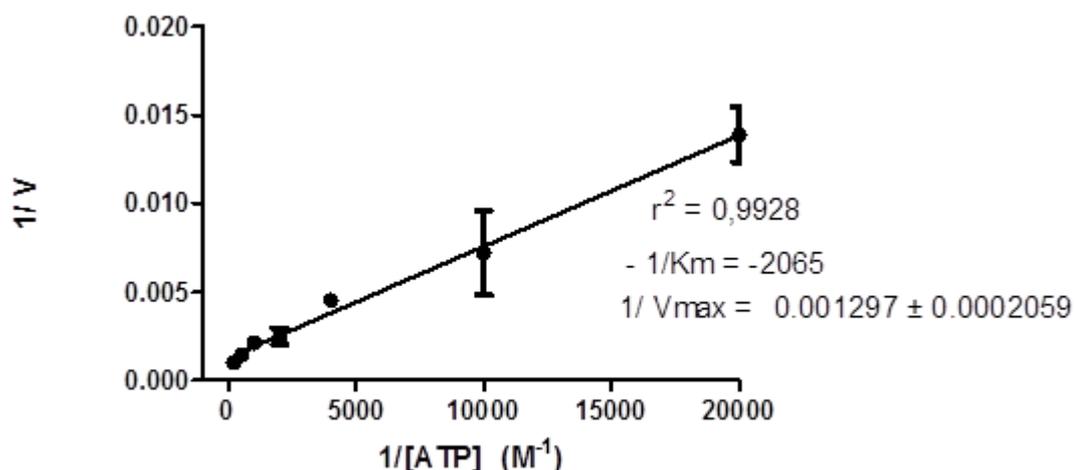


Figura 14. Aplicación del método de Lineweaver Burk para determinar las constantes de cinética enzimática “aparentes” de la reacción enzimática de DAGK en la FNF. El gráfico fue realizado con los datos obtenidos en la Figura 13.

I.2.2.1.4 Dependencia de la actividad enzimática DAGK con la concentración de DAG.

A continuación se determinaron las condiciones de saturación de la DAGK con respecto a la concentración de DAG. El ensayo enzimático fue realizado en presencia de ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ como sustrato radiomarcado, utilizando una concentración saturante de ATP no radiomarcado (4 mM) y concentraciones variables de DOG. Al igual que en el caso anterior, la velocidad de la reacción enzimática (producción de PA marcado) sigue una cinética de Michaelis-Menten.

En condiciones que aseguraron el aporte suficiente del cosustrato de la reacción enzimática, ATP, la generación de PA se incrementó en forma lineal hasta una concentración de 2 mM de DOG, mientras que a concentraciones superiores la actividad DAGK mostró un comportamiento de saturación (Figura 15).

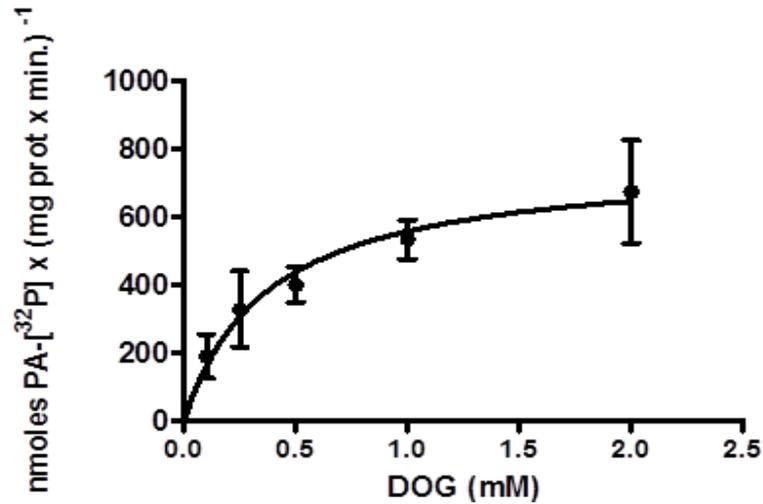


Figura 15. Determinación de la actividad DAGK en función de la concentración de DOG en la FNF.

La reacción enzimática se llevó a cabo a 37°C durante 10 min, en presencia de ATP-[γ -³²P] (3 μ Ci por muestra) como sustrato radiomarcado, utilizando una concentración saturante de ATP (4 mM) y concentraciones variables de DOG. Las distintas condiciones fueron ensayadas por triplicado. Los resultados fueron expresados como nmoles PA-[³²P] x (mg prot x min.)⁻¹.

El valor de K_m^{DOG} , que es la concentración de DOG en la que se alcanza la $\frac{1}{2}$ de la $V_{m\acute{a}x}$ en presencia de una concentración saturante de ATP (4 mM) es de 0,1345 mM (Figura 16).

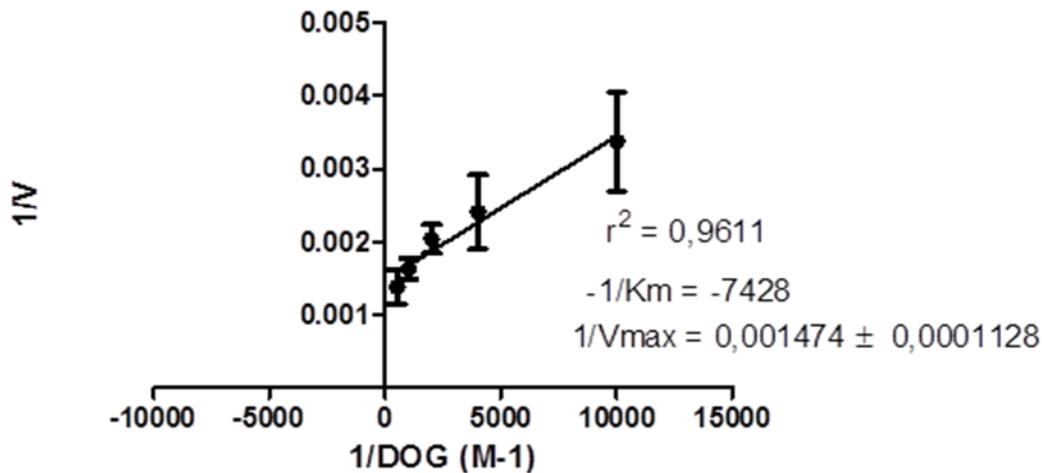


Figura 16. Aplicación del método de Lineweaver Burk para determinar las constantes de cinética enzimática "aparentes" de la reacción enzimática de DAGK en la FNF. El gráfico fue realizado con los datos obtenidos en la Figura 15.

1.2.2.2 Efectos de los agentes tensioactivos en la generación de PA a partir de DAG.

Se conoce que los detergentes son importantes herramientas para evaluar la actividad de ciertas enzimas, ya que pueden favorecer la accesibilidad al sustrato y aumentar la disponibilidad de los sitios activos de la enzima.

Con el fin de definir las mejores condiciones para medir la actividad DAGK en la FNF, se evaluó el efecto de los detergentes DCNa, Tritón X-100 y OG sobre la generación de PA a partir de DAG. El ensayo enzimático fue realizado utilizando ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ como sustrato radiomarcado, y DOG ó SAG como sustratos lipídicos.

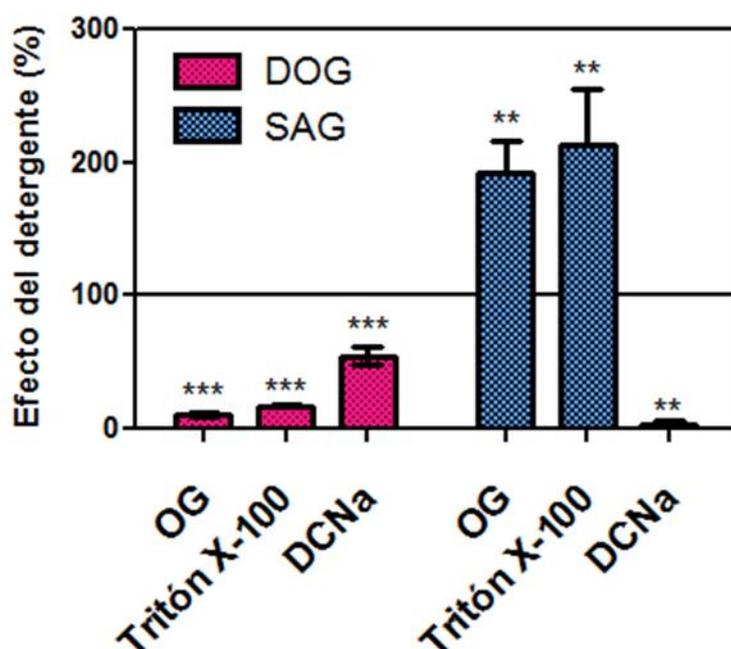


Figura 17. Efecto de los detergentes sobre la actividad DAGK en la FNF. Los núcleos de la FNF (100 μg de proteína) se incubaron en presencia de Tritón X-100 15 mM, OG 50 mM o DCNa 1 mM, usando ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ (3 μCi por muestra) como sustrato radiomarcado, ATP 250 μM y DOG ó SAG (500 μM) como sustratos lipídicos. La reacción enzimática se llevó a cabo durante 10 min a 37°C. Los resultados fueron expresados como Efecto del detergente (%). *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$.

En la Figura 17 se pueden observar las relaciones porcentuales con respecto a la condición sin detergente (considerada como 100 %), es decir, se puede analizar el efecto de los detergentes sobre la utilización de ambos sustratos.

Los resultados indican que cuando el DOG fue ofertado a la enzima utilizando micelas constituidas por detergentes no iónicos, tales como OG o Tritón X-100, la formación de PA disminuyó en un 90 % y 83 % respectivamente con respecto a la condición sin detergente. Cuando se utilizó el detergente iónico DCNa en la micela lípido-detergente, la transformación de DOG en PA disminuyó en un 45 % con respecto a la condición sin detergente. Es decir, los detergentes analizados (iónicos y no iónicos) indujeron una disminución de la actividad DAGK cuando se utilizó DOG como sustrato exógeno. Llamativamente, cuando se utilizó SAG como sustrato exógeno, ambos detergentes no iónicos indujeron un incremento significativo de la actividad DAGK (de un 93 % en el caso de OG, y de un 113 % en el caso de Tritón X-100) con respecto a la condición sin detergente. Sin embargo, el detergente iónico DCNa produjo una disminución significativa de la formación de PA a partir de SAG (92 %).

A continuación se realizó un análisis de la preferencia de la/s DAGK nuclear/es por los sustratos en presencia de los detergentes antes mencionados. Las relaciones porcentuales con respecto a la condición en ausencia de DAG exógeno (efecto de los lípidos) son presentados en la Figura 18. El 100 % corresponde a la actividad obtenida con el detergente respectivo pero en ausencia de sustrato exógeno. Los valores obtenidos con Tritón X-100 son muy elevados debido a que el detergente inhibe la actividad basal de la enzima.

Como se puede observar en la Figura 18, en presencia de OG ó Tritón X-100, el SAG fue el sustrato más utilizado por la/s DAGK presente/s en la FNF. Sin embargo, en presencia de DCNa, el DOG y el SAG fueron igualmente utilizados por la/s DAGK. La mayor transformación de DAG (DOG o SAG) por la DAGK fue observada en presencia de Tritón X-100.

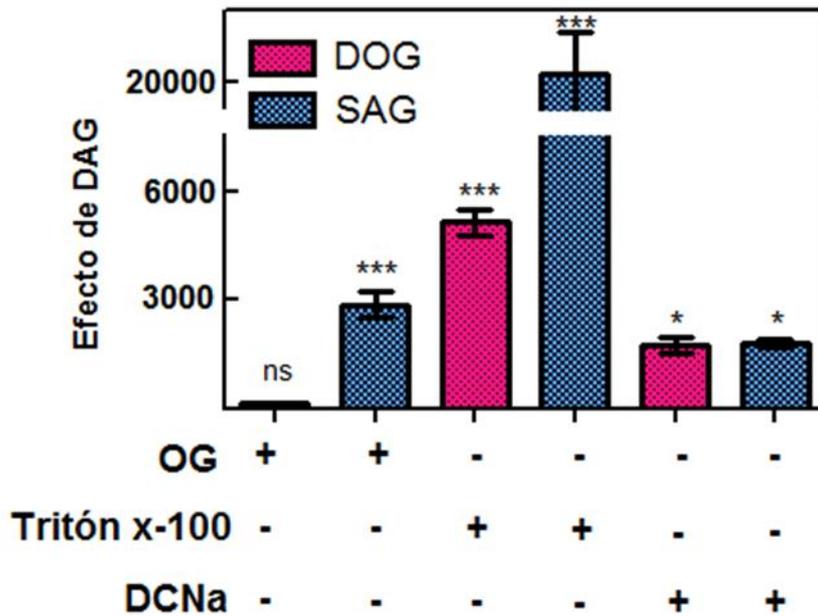


Figura 18. Efecto del sustrato lipídico sobre la actividad DAGK en la FNF. Los núcleos de la FNF (100 μ g de proteína) se incubaron en presencia de Tritón X-100 15 mM, OG 50 mM o DCNa 1 mM, usando ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ (3 μ Ci por muestra) como sustrato radiomarcado, ATP 250 μ M y DOG ó SAG (500 μ M) como sustratos lipídicos. La reacción enzimática se llevó a cabo durante 10 min a 37°C. Los resultados fueron expresados como Efecto de DAG. *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$.

Los resultados presentados en la Figura 17 demostraron que los detergentes afectan significativamente a la actividad DAGK en la FNF. Estos además sugirieron la presencia de más de una isoforma en la fracción nuclear en estudio.

Reportes previos de otros grupos de investigación demostraron que la DAGK ϵ tiene preferencia por el diacilglicerol que contiene ácido araquidónico (20:4) en la posición 2 (SAG), y que esta selectividad de sustrato es favorecida en presencia de los detergentes no iónicos OG o Tritón x-100 (Thirugnanam y col., 2001). Los resultados presentados en la Figura 18, que mostraron una mayor formación de PA a partir de SAG, en presencia de OG y Tritón X-100, sugieren fuertemente que la DAGK ϵ podría ser una de las isoformas presentes en la FNF.

1.2.3 Vías de señalización relacionadas con el metabolismo del DAG, activadas en la FNF por la exposición de las retinas bovinas a la luz.

1.2.3.1 Análisis de marcadores de daño en la FNF proveniente de retinas expuestas a la luz o mantenidas en oscuridad.

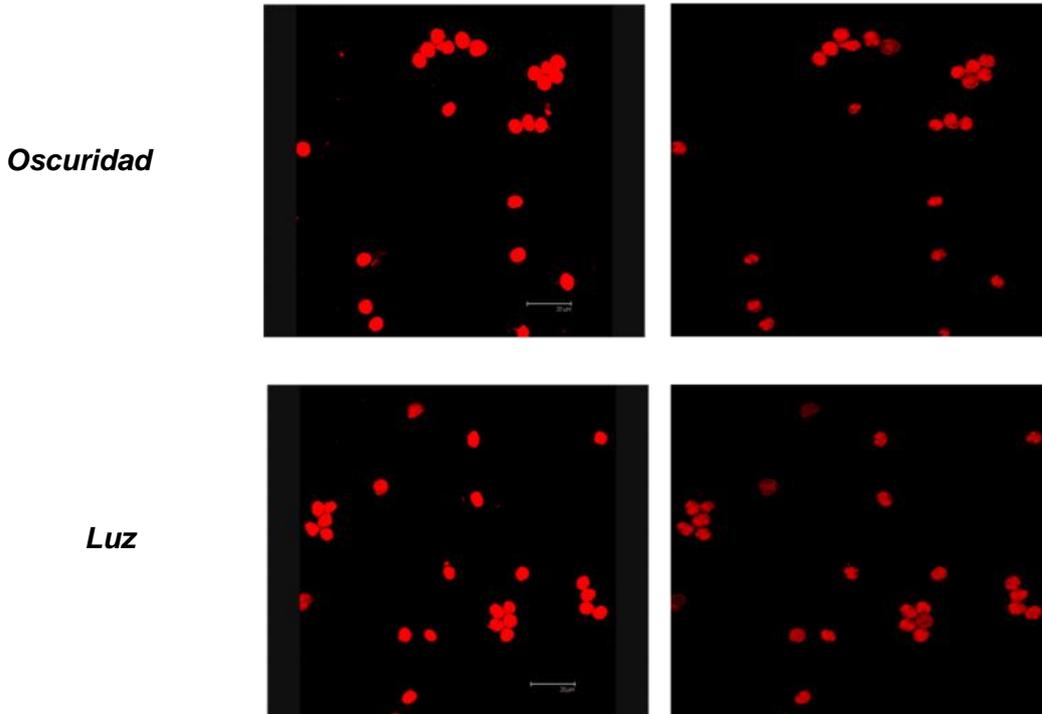
Está descrito en la bibliografía que la exposición de las retina a la luz intensa y/o constante durante largos periodos (con distintos protocolos) puede desencadenar procesos apoptóticos ó la generación de especies reactivas al oxígeno (Narimatsu y col., 2013; Tanito y col., 2007; Saenz-de-Viteri y col., 2014). Para determinar si el protocolo utilizado en la presente tesis doctoral (la exposición de la copa del ojo bovino a luz de una intensidad de 280 cd/ m³ (3000 luxes) durante 30 min induce algún tipo de daño en la retina, se realizaron dos abordajes experimentales: a) Tinción de la FNF con la sonda nuclear fluorescente yoduro de propidio para determinar si el protocolo de exposición a la luz induce fragmentación del ADN (Figura 19 a) y b) determinación de los niveles de peroxidación lipídica en el homogenado de la retina, midiendo la formación de *TBARS* (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico) (Figura 19 b).

Las imágenes obtenidas por microscopía confocal corresponden a una sumatoria de las imágenes obtenidas en varios planos de las muestras. Esto implica que las imágenes obtenidas podrían enmascarar la existencia de una eventual fragmentación del ADN. Por este motivo, en la determinación a) se analizaron cada uno de los diferentes planos focales de los campos observados por microscopía confocal, estrategia que permite definir más claramente el fenómeno de fragmentación, típico de un daño que conduce a la apoptosis.

Como se muestra en la Figura 19 a), nuestras condiciones experimentales no indujeron fragmentación del ADN. Por otro lado, la formación de *TBARS* fue débilmente detectada tanto en el homogenado de las retinas control (mantenidas en oscuridad) como en aquel proveniente de las retinas expuestas a la luz (Figura 19 b).

Ambos resultados demostraron que el modelo de exposición de las retinas bovinas a la luz propuesto en esta tesis doctoral no induce un daño detectable por las técnicas utilizadas para su análisis.

a)

Diferentes planos focales

b)

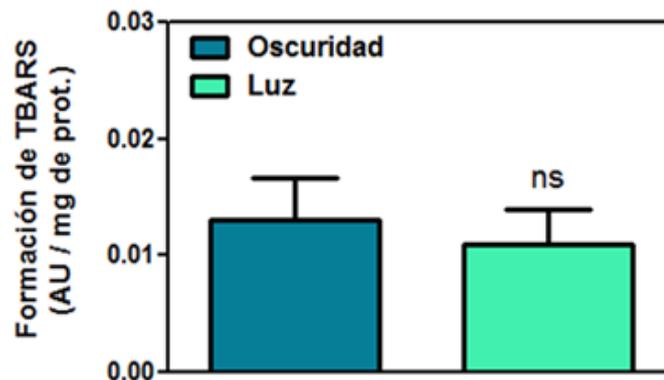


Figura 19. Análisis de daño por la exposición a la luz. a) Las FNF provenientes de las retinas expuestas a la luz o mantenidas en oscuridad fueron teñidas con yoduro de Propidio y los distintos planos focales de las muestras fueron observados por microscopía confocal, como fue detallado en la sección de materiales y métodos, para detectar una posible fragmentación del ADN. b) Los niveles de TBARS (indicadoras de peroxidación lipídica) fueron determinados en los homogenados de las retinas expuestas a la luz o mantenidas en oscuridad, como fue detallado en la sección de materiales y métodos. Los datos fueron expresados como unidades arbitrarias (AU /mg prot.).

1.2.3.2 Efectos de la luz sobre la actividad DAGK en la FNF.

Con el fin de explorar los efectos de la luz sobre la actividad DAGK en los núcleos de las células fotorreceptoras, se realizaron ensayos de actividad enzimática empleando una micela lípido-detergente constituida por DAG- ^3H (sustrato radiomarcado) y el agente tensioactivo Tritón X-100. Los resultados obtenidos en la FNF fueron comparados con aquellos correspondientes a la fracción nuclear de la retina (FNR).

Los resultados presentados en la Figura 20 muestran que la formación de PA se incrementó en un 275 % en la FNF proveniente de las retinas expuestas a la luz respecto de la condición control (oscuridad). Bajo estas condiciones experimentales, la actividad DAGK fue significativamente mayor en la FNF que en la FNR (200 % en el control, y 600 % en la condición de luz). Llamativamente, no se observaron cambios significativos de la actividad DAGK en la FNR por el efecto de la luz, sugiriendo que el estímulo de la actividad DAGK por la acción de la luz observado en la FNF (en presencia de Tritón X-100, DAG- ^3H y ATP) es una respuesta selectiva de los núcleos de las células fotorreceptoras.

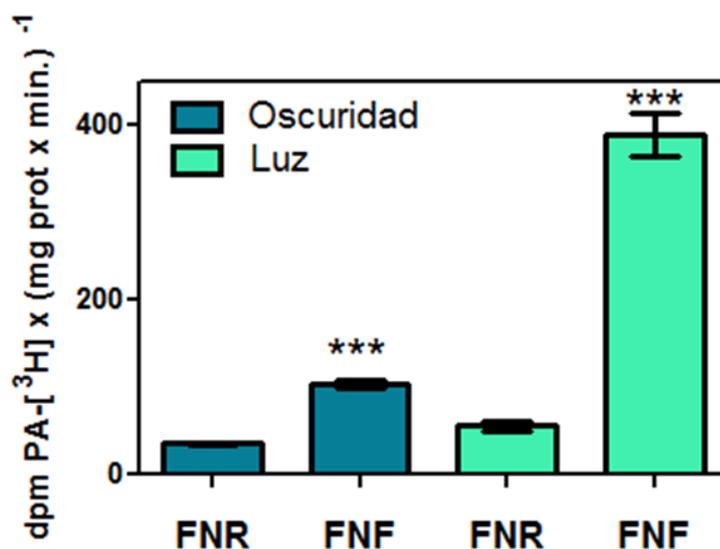


Figura 20. Efectos de la luz sobre la actividad DAGK en la FNR y en la FNF. La actividad DAGK fue determinada en la FNR y en la FNF provenientes de las retinas expuestas a la luz o a la oscuridad usando DAG- ^3H (sustrato radiomarcado), Tritón X-100 15 mM y ATP 250 μM . La reacción enzimática se llevó a cabo durante 10 min a 37°C. Los resultados fueron expresados como dpm PA- ^3H x (mg prot x min.) $^{-1}$. *** $p < 0,001$.

La actividad DAGK también fue analizada en las FNF provenientes de las retinas expuestas a la luz o a la oscuridad empleando ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ como sustrato radiomarcado, en presencia de DAG endógeno o de sustratos lipídicos exógenos tales como DOG ó SAG, en ausencia de detergentes.

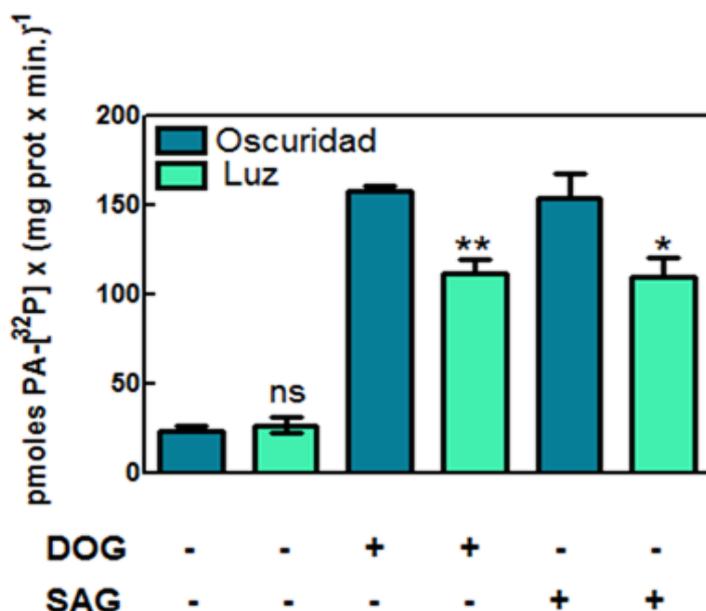


Figura 21. Efecto de la luz sobre la actividad DAGK en presencia de los sustratos exógenos DOG y SAG. Los niveles de formación de PA a partir de DAG fueron determinados en la FNF de retinas expuestas a la luz o a la oscuridad usando ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ como sustrato radiomarcado (3 μCi por tubo), ATP 250 μM , en presencia de DAG endógeno, o de sustratos lipídicos exógenos tales como DOG o SAG (500 μM), en ausencia de detergentes. La reacción enzimática se llevó a cabo durante 10 min a 37 °C. Los resultados fueron expresados como pmoles PA- ^{32}P x (mg prot x min.) $^{-1}$. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

Como se muestra en la Figura 21, la exposición de las retinas bovinas a la luz no produjo cambios significativos de la actividad DAGK en la FNF cuando el ensayo fue realizado en ausencia de DAG exógenos y de detergentes. Sin embargo, el estímulo lumínico indujo una disminución significativa de la formación de PA cuando los sustratos exógenos DOG y SAG estuvieron presentes en el ensayo enzimático. Las diferencias observadas en cuanto al efecto de la luz sobre la utilización de los sustratos en presencia o ausencia de los detergentes (un aumento de la actividad DAGK en presencia de Tritón X-100 (Figura 20), y una disminución en ausencia de detergentes (Figura 21), sugieren que en la FNF puede estar presente más de una

isoforma DAGK, y que su presencia y/o actividad podría ser diferencialmente modulada por la luz.

Como fue mencionado anteriormente, se ha demostrado que las isoformas de tipo I no tienen preferencia de sustrato, mientras que la DAGK ϵ presenta selectividad por el SAG, y la DAGK ζ tiene preferencia por el DOG o el SAG respecto a los sustratos mas saturados (Thirugnanam y col., 2001). Nuestros resultados previos obtenidos utilizando DOG y SAG, en ausencia y presencia de detergentes, como el Tritón X-100 y el OG, sugieren la presencia de la DAGK ζ y la DAGK ϵ en la FNF. Los resultados con DCNa, detergente preferido por isoformas solubles como las del tipo I, sugieren además la presencia de las mismas.

Para analizar indirectamente la contribución de las DAGK de tipo I, se realizó un ensayo enzimático empleando R59022, un inhibidor selectivo de las isoformas de tipo I (van Blitterswijk y Houssa, 2000) (Figura 22).

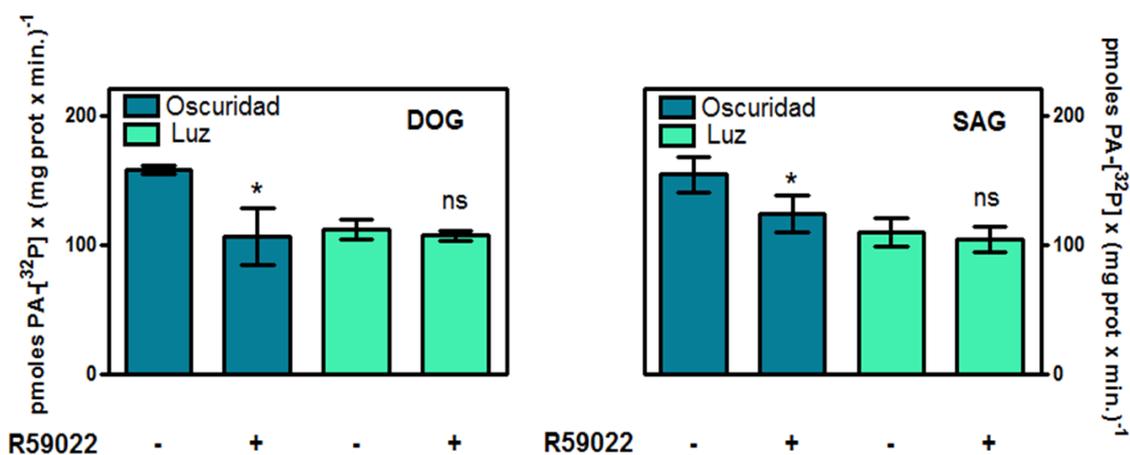


Figura 22. Contribución de las DAGK de tipo I a la actividad DAGK determinada en presencia de DOG y SAG en la FNF de las retinas expuestas a la luz o a la oscuridad. La reacción enzimática para determinar la actividad DAGK en la FNF fue realizada bajo las condiciones explicadas en la Figura 21, pero previamente a la incorporación de los sustratos de la reacción, se realizó una preincubación con R59022 10 μ M o su vehículo (DMSO 0,01 %). Los resultados fueron expresados como pmoles PA-[³²P] x (mg prot x min.)⁻¹. *p < 0,05.

Como se puede observar en la Figura 22, el empleo de R59022 en el ensayo enzimático indujo una disminución significativa de la actividad DAGK en presencia del

SAG (33 %) y del DOG (20 %) en la condición de oscuridad. Sin embargo, la exposición a la luz no indujo cambios significativos en la formación de PA nuclear bajo estas condiciones experimentales. Estos resultados sugieren que las DAGK de tipo I están presentes y/o activadas en la FNF solo en la condición control (oscuridad).

Los datos obtenidos del análisis de los efectos de la luz a partir de los experimentos llevados a cabo en presencia o ausencia de detergentes y utilizando DAG endógeno o los sustratos exógenos DOG o SAG sugieren que como consecuencia de la exposición de las retinas bovinas a la luz, pueden ocurrir cambios en la localización de distintas isoformas de DAGK en la FNF.

1.2.3.3 Efectos de la luz sobre la localización de las isoformas de tipo I, de la DAGK ϵ (tipo III), de la DAGK ζ (Tipo IV), y de la DAGK θ (tipo V) en la FNF.

El siguiente objetivo fue evaluar si la exposición de las retinas bovinas a la luz produce efectos sobre la localización de distintas isoformas de DAGK en la FNF. Para este fin, se llevaron a cabo ensayos de WB empleando los correspondientes anticuerpos primarios y secundarios para detectar a las isoformas DAGK α , β y γ (tipo I), DAGK ϵ (tipo III), DAGK ζ (tipo IV) y DAGK θ (tipo V) en la FNF.

Como se puede observar en la Figura 23, todas las isoformas de DAGK analizadas fueron halladas en la FNF. La exposición de las retinas bovinas a la luz indujo un incremento de un 50 % en el contenido de la DAGK ζ con respecto a la condición oscuridad, mientras que se observó una disminución en el contenido de las isoformas DAGK ϵ , DAGK β y DAGK θ (de un 30 %, un 38 % y un 65 %, respectivamente) por acción de la luz en la FNF. En cuanto a la DAGK α y la DAGK γ , no se observaron cambios significativos en el contenido nuclear de las mismas cuando las retinas fueron expuestas al estímulo lumínico con respecto a la condición control (oscuridad).

Ha sido reportado en la bibliografía que las isoformas DAGK ϵ and ζ requieren de condiciones diferentes para llevar a cabo su máxima actividad, y sobre la base de

estas diferencias observadas, se ha sugerido que las mismas posiblemente cumplen roles fisiológicos muy distintos en la célula (Thirugnanam y col., 2001). La localización diferencial de las distintas isoformas DAGK en la FNF, dependiente de la luz (Figura 23), es un interesante hallazgo que plantearía, para el caso de la DAGK ϵ , cuya característica es la preferencia por el SAG, una menor transformación del DAG proveniente de la hidrólisis de fosfoinosítidos en luz.

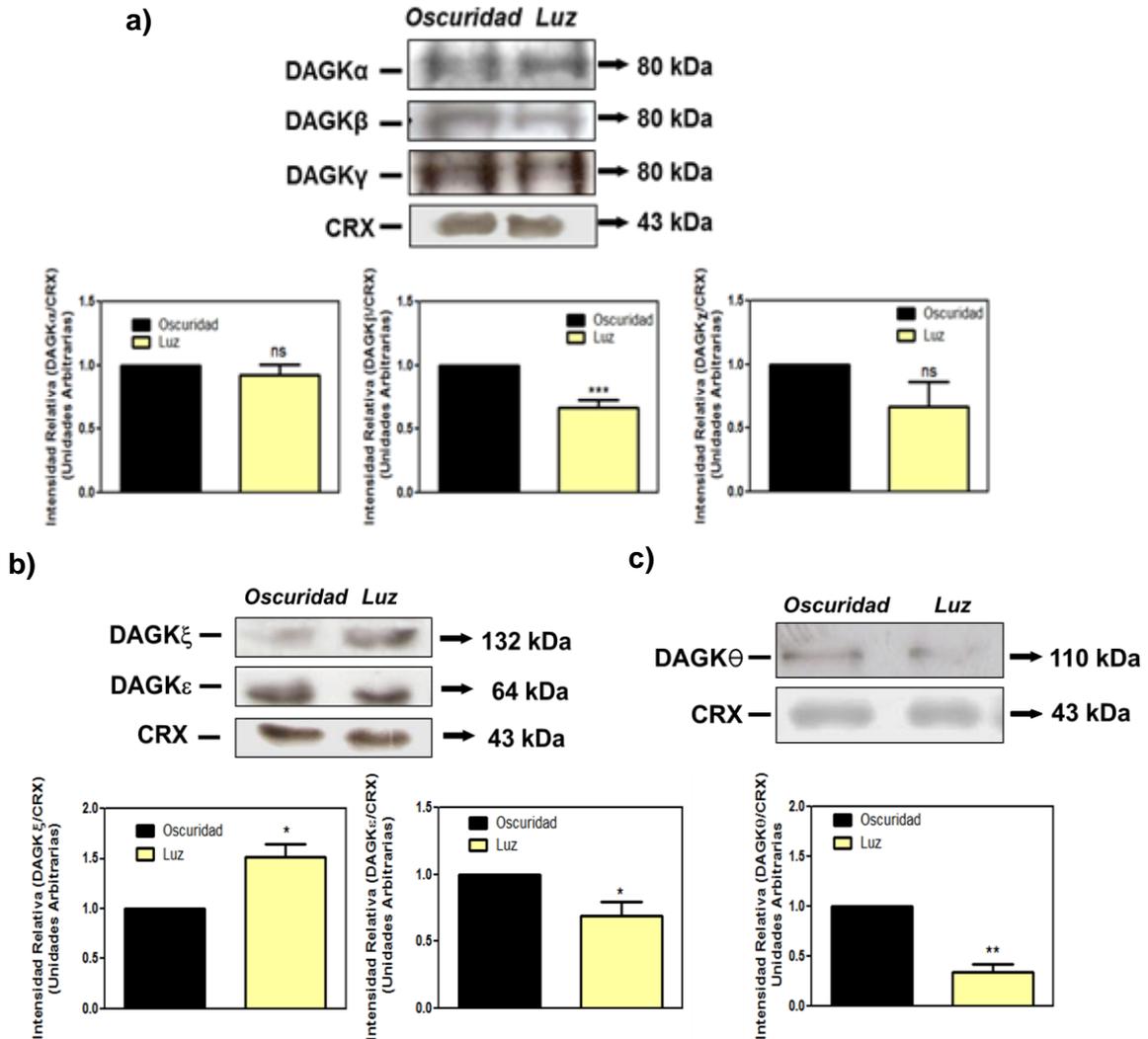


Figura 23. Efectos de la luz sobre la localización de distintas isoformas DAGK en la FNF. Las proteínas de la FNF (40 μ g) se resolvieron por SDS-PAGE al 10 % y se transfirieron a una membrana de PVDF. **a)** Detección de las isoformas de tipo I: incubación con los anticuerpos primarios de conejo (anti-DAGK α (1: 500, v/v), anti-DAGK β (1: 500, v/v), anti-DAGK γ (1: 500, v/v) toda la noche a 4 °C, y con el anticuerpo secundario anti-conejo (1: 1.000, v/v) durante dos horas a temperatura ambiente. **b) y c)** Detección de DAGK ζ , ϵ y θ : incubación con los anticuerpos primarios de conejo anti-DAGK ζ (1: 1.000, v/v), anti-DAGK ϵ (1: 1.000, v/v) y anti- DAGK θ (1: 1.000, v/v), toda la noche a 4 °C, y con el anticuerpo secundario anti-conejo (1: 1.000, v/v), durante dos horas a temperatura ambiente. Los resultados fueron expresados como intensidad relativa DAGK/ CRX. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

Para profundizar en estos estudios se plantearon a continuación ensayos enzimáticos destinados a determinar selectivamente la actividad de distintas isoformas DAGK en las FNF obtenidas a partir de las retinas bovinas expuestas a la luz o a la oscuridad.

1.2.3.4 Efectos de la luz sobre la actividad de la DAGK ζ y la DAGK ϵ en la FNF.

La formación de PA a partir de DAG fue estudiada bajo diferentes condiciones experimentales para evaluar selectivamente la actividad de la DAGK ζ o de la DAGK ϵ en las FNF provenientes de retinas expuestas a la luz o a la oscuridad.

Es conocido que la especificidad de la DAGK ϵ por el SAG así como la especificidad de la DAGK ζ por el DOG son relativas y no absolutas (Thirugnanam y col., 2001). También se sabe que si bien ciertos detergentes facilitan la accesibilidad de ciertas enzimas a su sustrato, este hecho tampoco es absoluto. Es por ello que para favorecer la actividad de la DAGK ζ y de la DAGK ϵ se debieron utilizar otras herramientas experimentales en los ensayos enzimáticos.

Un componente muy útil fue la DOPS puesto que ha sido demostrado que sus efectos sobre ambas isoformas son opuestos. La DOPS estimula la actividad de la DAGK ζ a la vez que inhibe a la DAGK ϵ (Thirugnanam y col., 2001). Para medir los efectos de la luz sobre la actividad de la DAGK ζ en la FNF, los núcleos proveniente de las retinas expuestas a la luz o a la oscuridad fueron utilizados en un ensayo enzimático empleando las siguientes condiciones experimentales: ATP-[γ - 32 P] como sustrato radiomarcado, DOG como sustrato exógeno en una micela lípido-detergente con Tritón X-100, DOPS (inhibidor de la DAGK ϵ) y R59022 (inhibidor de las DAGK de tipo I). Además, se evaluó la actividad DAGK en ausencia de los inhibidores DOPS y R59022.

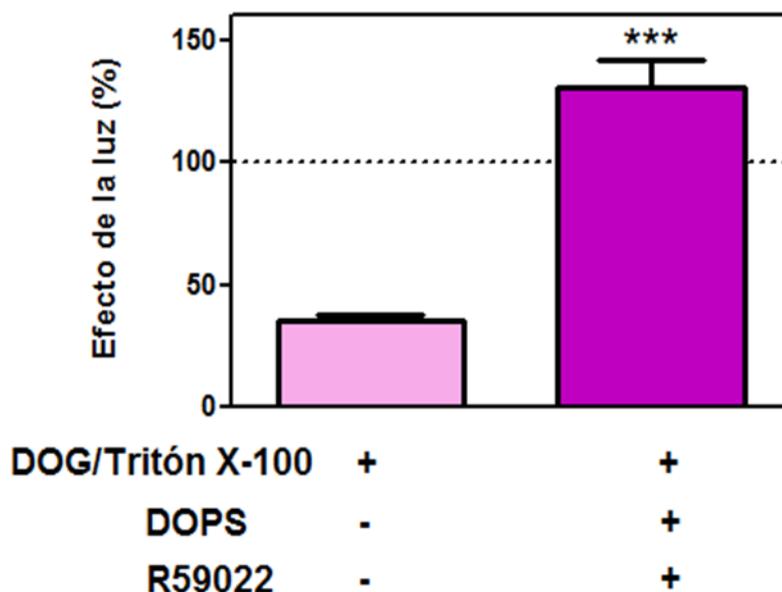


Figura 24. Efectos de la luz sobre la actividad DAGK bajo las condiciones adecuadas para medir selectivamente la actividad de la DAGK ζ . Se realizó un ensayo enzimático usando ATP-[γ - 32 P] (3 μ Ci) como sustrato radiomarcado, ATP 250 μ M y DOG 500 μ M como sustrato exógeno. Previo a la incorporación de los sustratos de la reacción enzimática, los núcleos fueron preincubados con DOPS 4 mM y R59022 10 μ M o sus vehículos, durante 10 min a 37 °C. La reacción enzimática se llevó a cabo por 10 min a 37°C. Los resultados fueron expresados como Efecto de la luz (%) en cada condición. ***p < 0.001.

Los resultados demostraron que la exposición de las retinas bovinas a la luz produjo un aumento de la formación de PA en la FNF con respecto al control (oscuridad), bajo las condiciones experimentales adecuadas para medir selectivamente la actividad de la DAGK ζ .

A continuación, para favorecer la actividad de la DAGK ϵ , se realizó un ensayo enzimático utilizando ATP-[γ - 32 P] como sustrato radiomarcado, una micela lípido-detergente constituida por SAG (sustrato lipídico exógeno) y OG, en presencia del inhibidor selectivo de las isoformas de tipo I, R59022, o en ausencia del mismo.

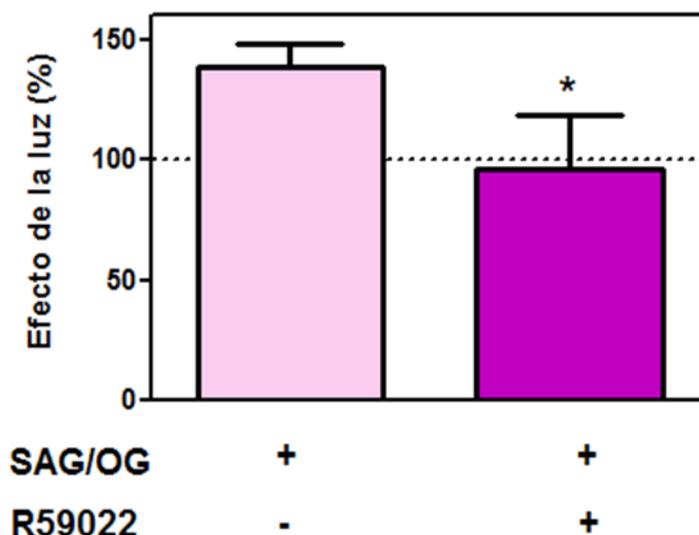


Figura 25. Efectos de la luz sobre la actividad DAGK empleando las condiciones adecuadas para favorecer la actividad de la DAGK ϵ . Con el objeto de medir selectivamente la actividad de la DAGK ϵ , se realizó un ensayo enzimático usando ATP-[γ - 32 P] 3 μ Ci como sustrato radiomarcado, ATP 250 μ M y DOG 500 μ M como sustrato lipídico exógeno. Previo a la incorporación de los sustratos de la reacción enzimática, los núcleos fueron preincubados con R59022 10 μ M, o su vehículo, durante 10 min a 37 °C. La reacción enzimática se llevó a cabo por 10 min a 37°C. Los resultados fueron expresados como Efecto de la luz (%) con respecto a la condición control (oscuridad), considerada como el 100 %. *p < 0.05.

Cuando se evaluó la actividad DAGK en presencia de la micela lípido-detergente SAG-OG en la FNF, la exposición de las retinas bovinas a la luz indujo un aumento en la formación de PA a partir de DAG de un 40 % con respecto a la condición control. Sin embargo, este aumento fue abolido cuando fue utilizado en el ensayo enzimático el inhibidor selectivo de las isoformas de tipo I, R59022. Estos resultados sugieren que el aumento de la formación de PA en presencia de SAG/OG no es mediado por la DAGK ϵ , sino que se debe a la actividad de las DAGK de tipo I, sensibles al inhibidor utilizado.

1.2.3.5 Efectos de la luz sobre la PKC α .

El DAG, sustrato de la DAGK, es un activador de las PKC. Ha sido reportado previamente en cultivos celulares que la PKC α y la DAGK ζ son correguladas (Luo y col., 2003a; Luo y col., 2003b). Dado que nuestros resultados previos demostraron que la luz induce un incremento en la localización y en la actividad de la DAGK ζ en la FNF,

el siguiente objetivo fue analizar la presencia de la PKC α en la FNF, y los efectos de la luz sobre su localización y su estado de fosforilación en los núcleos de las células fotorreceptoras. Para ello, se realizaron ensayos de WB utilizando los anticuerpos primarios y secundarios correspondientes para detectar a la PKC α total y a la PKC α en su estado fosforilado (pPKC α) (Figura 26).

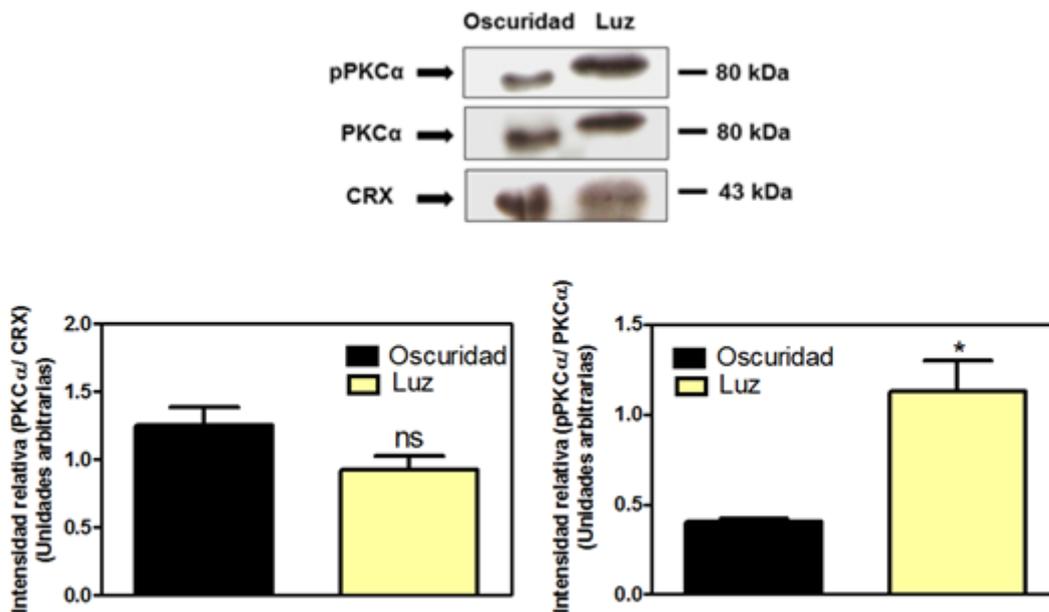


Figura 26. Efectos de la luz sobre la PKC α . Las proteínas de la FNF (40 μ g) se resolvieron por SDS-PAGE al 10 % y se transfirieron a una membrana de PVDF. Detección de la PKC α total y de la pPKC α : incubación con los anticuerpos primarios (monoclonal de ratón anti-PKC α (1: 1.000, v/v) y policlonal de conejo anti-pPKC α (1: 1.000, v/v)) durante 2 hs a temperatura ambiente y con los anticuerpos secundarios anti-ratón (1: 2.000 v/v) y anti-conejo (1: 1.000, v/v) durante dos horas a temperatura ambiente. Los resultados fueron expresados como intensidad relativa PKC α / CRX o pPKC α /PKC α . * $p < 0,05$.

Como se puede observar en la Figura 26, tanto la PKC α total como la PKC α fosforilada (pPKC α) fueron detectadas en las FNF provenientes de las retinas expuestas a la luz o a la oscuridad. La exposición de las retinas bovinas a la luz produjo un incremento significativo (275 %) de la forma fosforilada de PKC α con respecto a la condición control, mientras que no indujo cambios significativos en el contenido de la PKC α total en la FNF.

Teniendo en cuenta que el DAG no solo es un activador de las PKC de tipo convencional, como la PKC α , sino que además produce la activación de las PKC de tipo novel (como lo es la PKC δ), evaluamos la presencia de la PKC δ en los núcleos de células fotorreceptoras provenientes de retinas expuestas a la luz o a la oscuridad por WB, utilizando los anticuerpos correspondientes. La PKC δ no fue hallada en la FNF en las condiciones experimentales mencionadas.

1.2.3.6 Rol de las DAGK en la regulación del estado de fosforilación de la PKC α por luz.

Tal como se indicó en la Introducción, la fosforilación de la PKC es una precondition para su regulación por activadores tales como el DAG en el caso de las isoformas de tipo convencional como la PKC α . Dada esta característica, es natural que las isoformas DAGK, responsables de la síntesis de PA a partir de DAG, regulen la activación de la PKC por DAG. Sin embargo, otra posibilidad es que las DAGK regulen su grado de fosforilación. Esta hipótesis se basa en que ha sido reportado que el PA es inhibidor de proteínas fosfatasas (Kishikawa y col., 1999).

Con la finalidad de evaluar el rol de las DAGK en la regulación de la fosforilación de la PKC α en la FNF, se llevaron a cabo experimentos utilizando R59022 (inhibidor de las DAGK). Las condiciones del ensayo fueron las óptimas para propiciar la actividad DAGK y transformar el DAG nuclear en PA. Los núcleos de las células fotorreceptoras provenientes de las retinas bovinas expuestas a la luz o a la oscuridad fueron preincubados con DMSO (vehículo del inhibidor) ó con R59022, y luego se realizó el ensayo de WB utilizando los anticuerpos primarios y secundarios correspondientes para detectar a la PKC α total y a la PKC α en su estado fosforilado (pPKC α).

Para asegurar la eficacia de la inhibición se efectuó, en paralelo y con ATP-[γ ³²P], la medida de la actividad DAGK, confirmando la inhibición de la formación de PA en presencia de R59022 (resultado no mostrado).

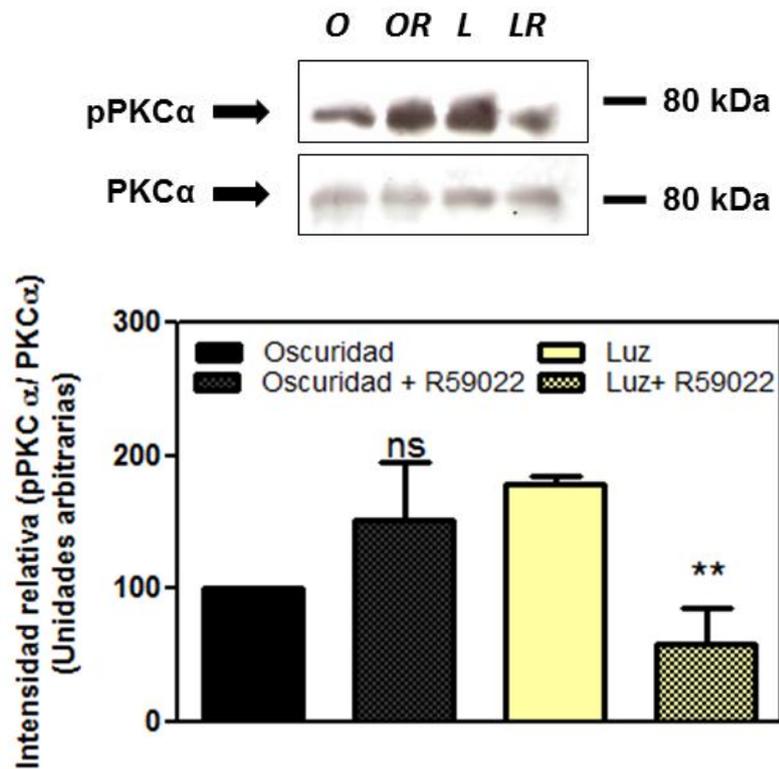


Figura 27. Efectos regulatorios de las DAGK sobre la fosforilación de la PKC α . Las FNF obtenidas de retinas expuestas a la luz o a la oscuridad fueron preincubadas en presencia de R59022 10 μ M o su vehículo (DMSO 0,01 %, condición control). El contenido de la PKC α y la pPKC α fue determinado siguiendo el procedimiento descrito en la Figura 26. Los resultados fueron expresados como intensidad relativa pPKC α /PKC α . **p < 0,01.

Como se puede observar en la Figura 27, el R59022 indujo una disminución significativa en el contenido de la pPKC α en la FNF proveniente de las retinas expuestas a la luz, mientras que no produjo cambios significativos en la fosforilación de la PKC α en la FNF proveniente de la condición control, la oscuridad. Este resultado demostró que la actividad DAGK, al menos la correspondiente a isoformas sensibles al inhibidor, podría intervenir en la regulación del estado de fosforilación de la PKC α en la FNF y que este mecanismo es dependiente de la luz.

1.2.3.7 Regulación de la actividad DAGK por las PKC en las FNF provenientes de las retinas bovinas expuestas a la luz o a la oscuridad.

El aumento del estado de fosforilación de la PKC α en la FNF dependiente de la luz podría, a su vez, generar una potencial modulación de la actividad de distintas isoformas de DAGK. Para estudiar si las PKC presentes en los núcleos de las células fotorreceptoras modulan la actividad DAGK, se realizaron ensayos enzimáticos utilizando ATP-[γ - 32 P] y SAG como sustratos, en ausencia de detergentes, preincubando a los núcleos con un activador de las PKC, el PMA, y/o con un inhibidor de las PKC, el BIM.

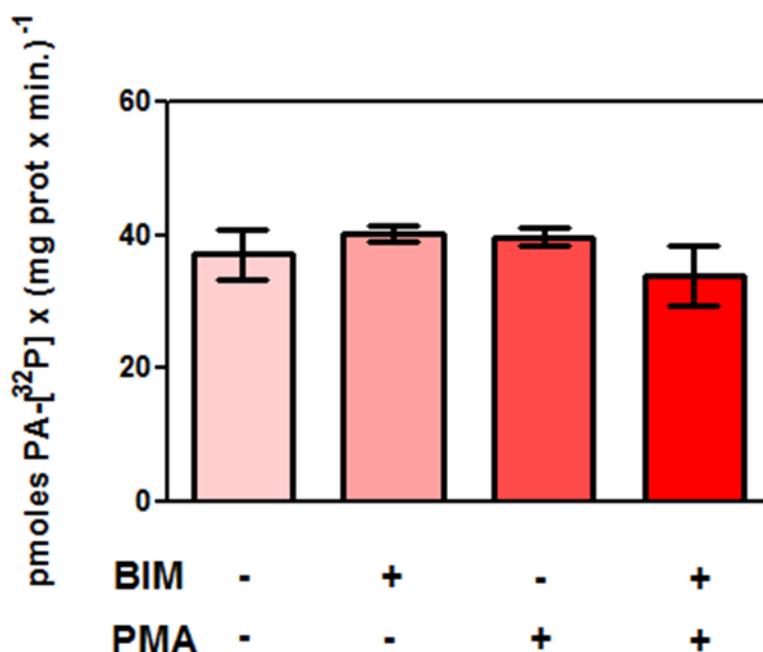


Figura 28. Regulación de la actividad DAGK por la PKC. Para determinar si la PKC es capaz de modular la actividad DAGK en la FNF, se llevó a cabo un ensayo enzimático realizando una preincubación de los núcleos de las células fotorreceptoras con un inhibidor de las PKC, BIM 5 μ M y con un activador de las PKC, PMA 2 μ M, o sus respectivos vehículos, durante 10 min a 37 °C. Luego se realizó una incubación empleando ATP-[γ - 32 P] (3 μ Ci por tubo), ATP 250 μ M y SAG 500 μ M como sustratos de la reacción enzimática, durante 10 min a 37 °C. Los resultados fueron expresados como pmoles PA x (mg prot x min.)⁻¹.

Los resultados mostraron que no se produjeron cambios significativos de la actividad DAGK en la FNF en presencia del activador de las PKC, PMA o del inhibidor de las PKC, BIM. Estos resultados sugieren que la actividad DAGK no es modulada por la/s PKC presente/s en el núcleo de las células fotorreceptoras.

1.2.3.8 Rol de la PIP₂-PLC sobre la actividad DAGK en las FNF provenientes de las retinas bovinas expuestas a la luz o a la oscuridad.

Se conoce que la fosfolipasa C γ 1 (PLC γ 1) está presente en los segmentos externos de los fotorreceptores y es regulada por la acción de la luz (Ghalayini y col., 1998). Esta isoforma colocaliza con la PKC α en el segmento interno de los fotorreceptores del renacuajo y ambas han sido relacionadas con la migración de la arrestina por acción de la luz (Orisme y col., 2010). Por otra parte, la fosfolipasa C γ 1 (PLC γ 1) ha sido detectada previamente en el complejo de señalización de PKC α y DAGK ζ en células en cultivo (Luo y col., 2003). Teniendo en cuenta estos datos bibliográficos y nuestros hallazgos antes mencionados, decidimos analizar si la actividad DAGK detectada en la FNF es modulada por la activación de una PIP₂-PLC. Las retinas bovinas fueron preincubadas con U73122 (inhibidor de la PIP₂-PLC) durante 15 min bajo la luz de una lámpara roja, y posteriormente fueron expuestas a la luz o mantenidas en oscuridad durante 30 min. El ensayo enzimático para determinar la actividad DAGK en la FNF se realizó en ausencia de DAG exógeno con el fin de evaluar los efectos del DAG generado de forma endógena a nivel nuclear, posiblemente por la activación de una PLC. La actividad DAGK también fue determinada en presencia de SAG para discriminar los posibles efectos no asociados a la formación del sustrato (Figura 29).

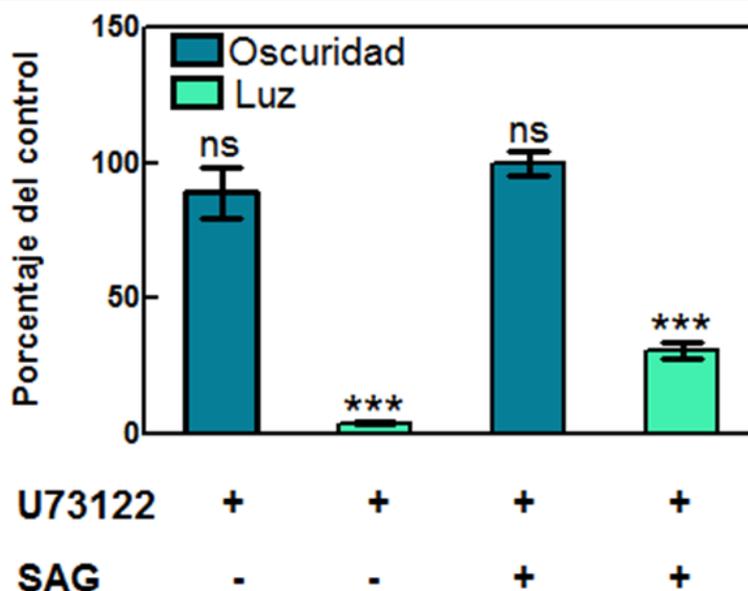


Figura 29. Rol de la PIP₂-PLC sobre la actividad DAGK en la FNF. Las copas de los ojos bovinos fueron preincubadas con U73122 10 μ M o con su vehículo (DMSO 0,01 %, condición control) en medio Ames oxigenado (O₂ 95 %, CO₂ 5 %), durante 15 min bajo la luz de una lámpara roja. Luego, fueron expuestas a la luz o a la oscuridad durante 30 min, y las FNF fueron aisladas como fue descrito en la sección de materiales y métodos. El ensayo enzimático fue realizado en presencia de ATP-[γ -³²P] (3 μ Ci por tubo), ATP 250 μ M y DAG endógeno o SAG 500 μ M como sustratos de la reacción enzimática, la cuál se realizó durante 10 min a 37 °C. Los resultados fueron expresados como porcentaje del control (considerado como 100 %). ***p < 0,001.

Como se puede observar en la Figura 29, en la condición de oscuridad el U73122 no produjo efectos significativos sobre la actividad DAGK con respecto a su control, mientras que en la FNF de las retinas expuestas a la luz el U73122 indujo una disminución significativa (90 %) en la formación de PA. Estos resultados indican que la actividad DAGK es dependiente de la activación previa de una PIP₂-PLC, y que esta activación ocurre en respuesta a la luz ya que no se observan cambios en la oscuridad.

La hipótesis lógica era que la actividad DAGK transformaba un DAG generado por una PIP₂-PLC. Cuando en el ensayo enzimático fue empleado el SAG para reemplazar al DAG endógeno producido por la PLC e inhibido bajo nuestras condiciones experimentales por U73122, llamativamente ocurrió una disminución significativa (70 %) de la formación de PA en la condición de luz. Estos resultados demostraron que el DAG no es el único mensajero derivado de la PLC involucrado en la regulación de la

actividad DAGK nuclear. De acuerdo a nuestros resultados, el DAG derivado de la PLC solo sería responsable de un 20 % de la actividad DAGK medida en la luz.

Ha sido reportado que el PIP_2 inhibe a la DAGK ϵ (Thirugnanam y col., 2001; Walsh y col., 1995). Teniendo en cuenta que la inhibición de la PIP_2 -PLC causa no solo una disminución del DAG sino también un incremento del sustrato de la reacción, PIP_2 , a continuación se realizó un ensayo enzimático para determinar los efectos del PIP_2 sobre la actividad DAGK en los núcleos de las células fotorreceptoras de las retinas bovinas expuestas a la luz o a la oscuridad. El ensayo enzimático fue realizado en presencia de neomicina, un polication que se une y secuestra al PIP_2 (James y col., 2004) utilizando $\text{ATP-}[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ como sustrato radiomarcado, como fue descrito en materiales y métodos (Figura 30).

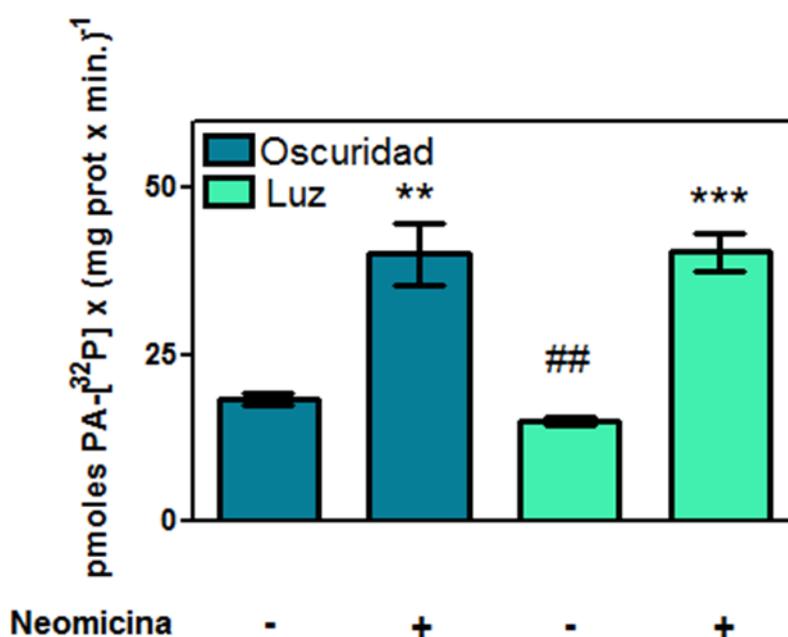


Figura 30. Rol del PIP_2 sobre la actividad DAGK en la FNF. Las copas de los ojos bovinos fueron preincubadas con neomicina 0,5 mM o con su vehículo (agua) en medio Ames oxigenado (O_2 95 %, CO_2 5 %), durante 15 min bajo la luz de una lámpara roja. Luego, fueron expuestas a la luz o a la oscuridad durante 30 min, y las FNF fueron aisladas como fue descrito en la sección de materiales y métodos. El ensayo enzimático fue realizado en presencia de $\text{ATP-}[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ (3 μCi por tubo), ATP 250 μM y DAG endógeno como sustratos de la reacción enzimática, durante 10 min a 37 °C. Los resultados fueron expresados como $\text{pmoles PA-}[\text{}^{32}\text{P}] \times (\text{mg prot} \times \text{min.})^{-1}$. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$.

Independientemente de la condición de oscuridad o luz, la preincubación con neomicina indujo un incremento significativo de la formación de PA en la FNF (Figura 30). Estos datos sugieren que el aumento de la actividad DAGK en presencia de neomicina (que secuestra al PIP_2) podría ser debido a un aumento de la actividad de la DAGK ϵ debido a la ausencia del efecto inhibitorio ejercido por el PIP_2 . Nuestros resultados, además, sugieren que la inhibición de la actividad DAGK por el U73122, observada en ausencia o en presencia de DAG, puede deberse parcialmente a la modulación negativa ejercida por el PIP_2 .

1.2.3.9 Rol de la PIP_2 -PLC sobre el contenido y estado de fosforilación de la PKC α en las FNF de las retinas bovinas expuestas a la luz o a la oscuridad.

Teniendo en cuenta que la fosfolipasa $\text{C}\gamma 1$ (PLC $\gamma 1$) ha sido detectada previamente en un complejo de señalización constituido por la PKC α y la DAGK ζ , y que los resultados de esta tesis doctoral demostraron que la actividad DAGK en la FNF, moduladora del estado de fosforilación de la PKC α , es dependiente de una previa activación de PIP_2 -PLC bajo la condición de luz, nos propusimos evaluar si el contenido nuclear y el estado de fosforilación de la PKC α es también dependiente de la activación corriente arriba de la PIP_2 -PLC.

Para tal fin, las retinas bovinas fueron preincubadas con U73122 (inhibidor de PIP_2 -PLC) durante 15 min, y posteriormente expuestas a la luz o mantenidas en la oscuridad durante 30 min. Las fracciones nucleares obtenidas fueron utilizadas para realizar ensayos de WB siguiendo el protocolo detallado en materiales y métodos, y empleando los anticuerpos primarios y secundarios correspondientes para detectar a la PKC α total y a la PKC α en su estado fosforilado (pPKC α).

Los resultados se muestran a continuación (Figura 31).

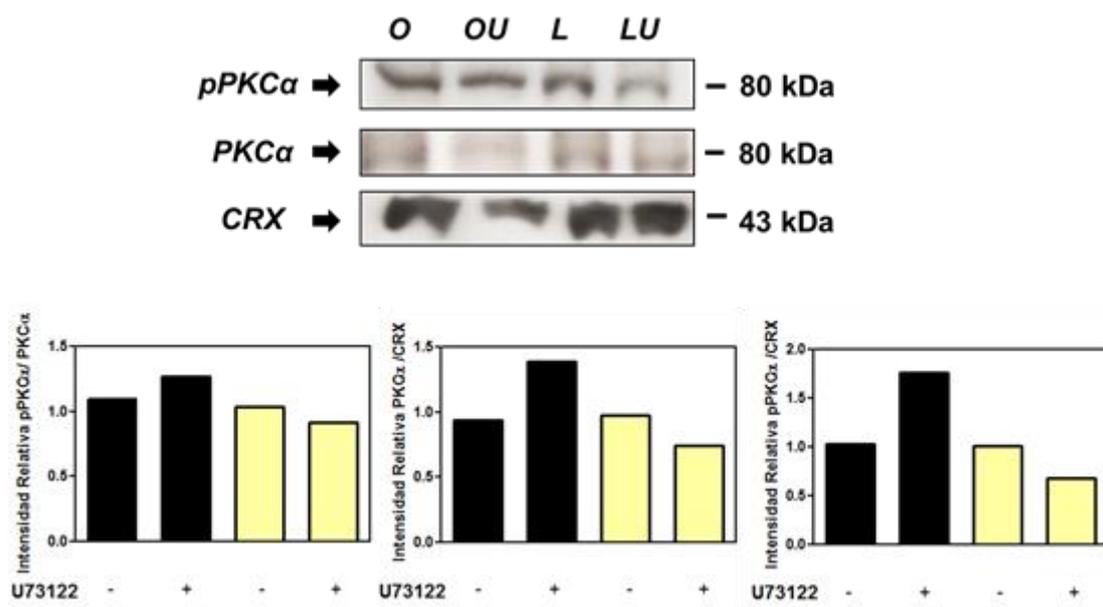


Figura 31. Rol de la PIP₂-PLC sobre el estado de fosforilación de la PKCα en las FNF de las retinas expuestas a la luz o a la oscuridad. Las copas de los ojos bovinos fueron preincubadas con U73122 10 μM o con su vehículo (DMSO 0,01 %, condición control) en medio Ames oxigenado (O₂ 95 %, CO₂ 5 %), durante 15 min bajo la luz de una lámpara roja. Luego, fueron expuestas a la luz o a la oscuridad durante 30 min, y las FNF fueron aisladas como fue descrito en la sección de materiales y métodos. El contenido de la PKCα y de la pPKCα en la FNF fue determinado siguiendo el procedimiento descrito en la Figura 26. Los resultados fueron expresados como las intensidades relativas de pPKCα/total PKCα, total PKCα/CRX y pPKCα/CRX.

Estos resultados preliminares nos permitieron determinar que la inactivación de una PIP₂-PLC produce cambios tanto en el estado de fosforilación como en los niveles totales de la PKCα en la FNF. Además, dichos cambios en el contenido de la PKCα son dependientes de la luz, observándose un aumento de los mismos en presencia de U73122 en la condición control y una disminución de ambos cuando la vía de la PIP₂-PLC es inhibida por el U73122 en la condición de luz.

Estos resultados se obtuvieron en condiciones equivalentes a los obtenidos cuando la actividad DAGK fue evaluada en presencia del inhibidor U73122, los cuales demostraron una disminución de la misma en la condición luz (Figura 29). Asimismo, de acuerdo a las experiencias realizadas con el inhibidor de las DAGK, el R59022, la disminución en la formación de PA, ejerció también una regulación negativa en el

contenido de la pPKC α (Figura 27). Estos resultados nos permiten sugerir que la disminución de la formación de PA (por inhibición con el R59022 ó con el U73122) podría estar regulando negativamente el estado fosforilado de PKC debido a que el PA es un inhibidor de las PP1 fosfatasas (Kishikawa y col., 1999).

RESULTADOS

CAPÍTULO II: “Activación de vías de señalización de insulina y sus efectos a nivel nuclear en condiciones de luz u oscuridad”

II.1 ANÁLISIS DE LOS EFECTOS DE LA LUZ SOBRE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN RELACIONADAS CON LA INSULINA.

Datos bibliográficos han reportado que en respuesta a la luz se produce la activación del receptor de insulina en los segmentos externos de la retina bovina (Rajala y col., 2002). Este efecto es dependiente de la rodopsina activada pero es independiente de la activación de la transducina. Sobre la base de estos hallazgos, nos propusimos determinar si distintos componentes de las vías de señalización activadas en respuesta a la insulina, tales como la vía de la PI3K/Akt, y la vía de las MAPK están presentes en los núcleos de las células fotorreceptoras, y si la exposición de las retinas bovinas a la luz induce algún cambio en el estado de activación de los mismos a nivel nuclear.

Los núcleos de las células fotorreceptoras provenientes de las retinas expuestas a la luz o a la oscuridad fueron tratados para su posterior análisis por WB. Los componentes de las vías de señalización activadas por la insulina fueron determinados en ambas condiciones mediante el empleo de los anticuerpos primarios y secundarios correspondientes. Los componentes de la vía de señalización de las MAPK analizados fueron: ERK1/2, su forma fosforilada (pERK1/2) y la forma fosforilada de p38 (fosfo-p38) (Figura 32).

Como se puede observar en la Figura 32, la exposición de las retinas bovinas a la luz produjo un incremento significativo (100 %) del contenido de ERK1/2, sin inducir cambios significativos en los niveles de pERK con respecto a ERK total. Estos resultados sugieren que la luz induce la translocación de ERK en su estado fosforilado (activado) a los núcleos de las células fotorreceptoras. Por otra parte, el estímulo lumínico indujo un aumento del contenido de fosfo-p38 en la FNF, el cual es un componente de la vía de señalización de las MAPK que actúa corriente abajo de ERK1/2. Estos resultados sugieren que la luz produce la activación de varios componentes de la vía de señalización de las MAPK.

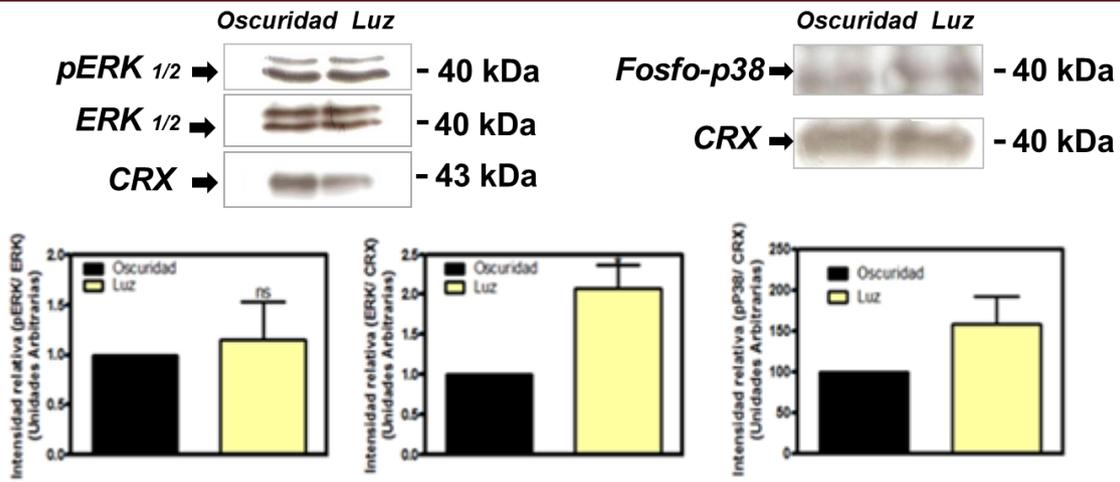


Figura 32. Efectos de la luz sobre la vía de señalización de las MAPK en la FNF. Las proteínas de la FNF (40 µg) se resolvieron por SDS-PAGE al 10 % y se transfirieron a una membrana de PVDF. Detección de ERK total, pERK y fosfo-p38: incubación con los anticuerpos primarios de conejo anti-pERK (1: 1.000, v/v), anti-ERK (1: 1.000, v/v) y anti-fosfo-p38 (1: 1.000, v/v) toda la noche a 4 °C, y con el anticuerpo secundario anti-conejo (1: 1.000, v/v) durante dos horas a temperatura ambiente. Los resultados fueron expresados como intensidad relativa ERK/ CRX, pERK/ERK y fosfo-p38/CRX. *p < 0,05.

En cuanto a la vía de las PI3K-Akt, fue determinada la presencia de Akt total y Akt activada (pAkt) en las FNF de las retinas expuestas a la luz o a la oscuridad (Figura 33).

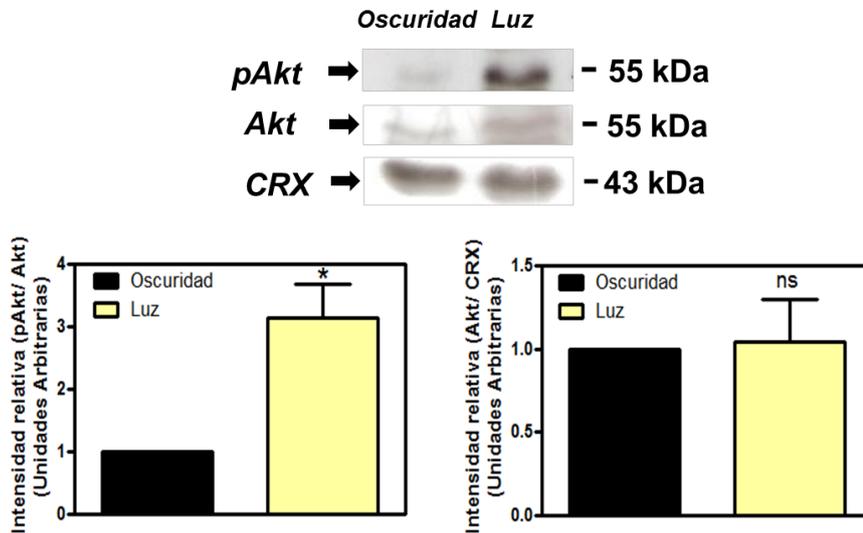


Figura 33. Efectos de la luz sobre Akt en la FNF. Las proteínas de la FNF (40 µg) se resolvieron por SDS-PAGE al 10 % y se transfirieron a una membrana de PVDF. Detección de Akt total y pAkt: incubación con los anticuerpos primarios de conejo anti-pAkt (1: 1.000, v/v) y anti-Akt (1: 1.000, v/v) toda la noche a 4 °C, y con el anticuerpo secundario anti-conejo (1: 1.000, v/v) durante dos horas a temperatura ambiente. Los resultados fueron expresados como intensidad relativa Akt/ CRX y pAkt/Akt. *p < 0,05.

En la Figura 33 se observa que como consecuencia de la exposición de las retinas bovinas a la luz se produjo un incremento significativo (200 %) en el contenido de Akt fosforilado (pAkt) en la FNF, sin cambios en el contenido de Akt total. Estos resultados indicaron que Akt está presente en la FNF y que la luz induce una activación de la misma, lo que resulta en un aumento de su forma fosforilada.

II.2 ANÁLISIS DE LOS EFECTOS DE LA INSULINA SOBRE LA ACTIVIDAD DAGK EN LOS NÚCLEOS DE LAS CÉLULAS FOTORRECEPTORAS.

II.2.1 Efectos directos e indirectos de la insulina sobre la actividad DAGK.

Sobre la base de los resultados previos, donde se observó una activación de componentes de las vías de señalización relacionadas con la insulina en respuesta a la luz, a continuación se evaluaron los efectos de la insulina sobre la actividad DAGK en los núcleos de células fotorreceptoras provenientes de las retinas bovinas expuestas a la luz o a la oscuridad.

Para ello, se realizaron dos abordajes experimentales: en primer lugar se analizaron los efectos que produce la incubación de las retinas bovinas con la insulina, a nivel nuclear. En este caso, las copas de los ojos bovinos fueron preincubadas en oscuridad con insulina 0,2 μ M en presencia de vanadato 0,2 mM, inhibidor de las tirosina fosfatasas, cuya función es evitar la desfosforilación de los residuos de tirosina de los receptores de tipo tirosina-quinasa, como lo es el receptor de insulina. Luego, se realizó la exposición de las copas de los ojos a la luz o a la oscuridad. A continuación se llevó a cabo un ensayo enzimático para determinar la actividad DAGK nuclear, utilizando las FNF obtenidas de estas condiciones, en presencia de ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ como sustrato radiomarcado, y en ausencia de DAG exógeno y de detergentes. Un segundo experimento tuvo como propuesta evaluar los efectos de la insulina directamente sobre los núcleos aislados de la FNF. Para ello, se realizó la exposición de las retinas

bovinas a la luz-oscuridad y a continuación se realizó el aislamiento de los núcleos de la FNF, los cuales fueron empleados en el ensayo enzimático para determinar la actividad DAGK. El ensayo consistió en una incubación de las fracciones nucleares con vanadato 0,2 mM e insulina 0,2 μ M y ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ como sustrato radiomarcado, en ausencia de DAG exógenos y de detergentes.

Por último, en ambas condiciones experimentales (luz y oscuridad), se analizó el efecto de la incubación con insulina en la copa del ojo y su posterior incubación en los núcleos aislados.

Los resultados correspondientes a ambos experimentos se muestran a continuación:

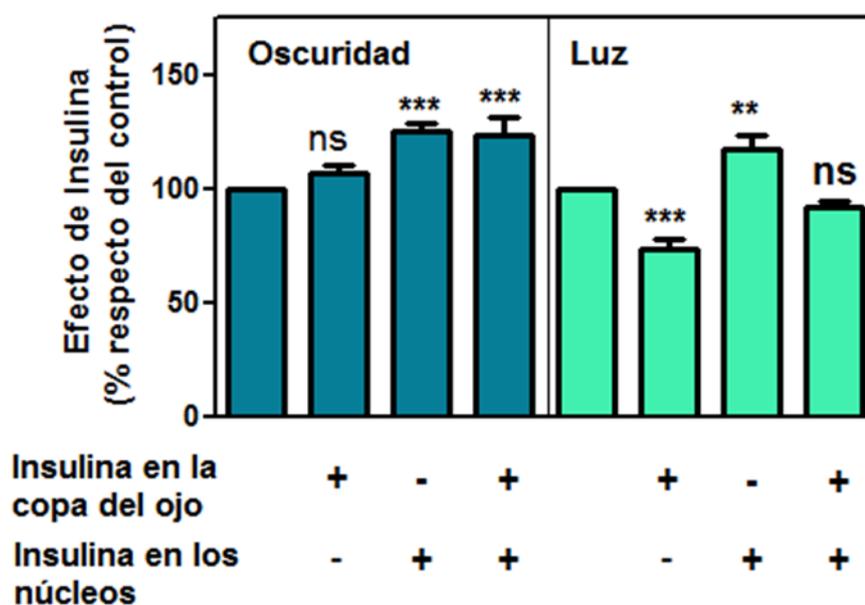


Figura 34. Efectos directos e indirectos de la insulina sobre la actividad DAGK en la FNF. Las copas de los ojos bovinos fueron preincubadas con insulina 0,2 μ M y vanadato 0,2 mM o con su vehículo (condición control) en medio Ames oxigenado (O_2 95 %, CO_2 5 %), durante 15 min bajo la luz de una lámpara roja. Luego, fueron expuestas a la luz o a la oscuridad durante 30 min, y las FNF fueron aisladas como fue descrito en la sección de materiales y métodos. Las FNF provenientes de las retinas expuestas a la luz o a la oscuridad fueron incubadas con insulina 0,2 μ M o con su vehículo (BSA/agua) y vanadato 0,2 mM (incorporados al ensayo en forma conjunta), usando ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ (3 μ Ci por tubo), ATP 250 μ M y DAG endógeno como sustratos de la reacción enzimática, durante 10 min a 37 °C. Los resultados fueron expresados como efectos de insulina (% respecto del control) considerando a los controles de las condiciones de luz y oscuridad como 100 %. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$.

Como se puede observar en la Figura 34, la incubación de las retinas bovinas con insulina (efecto indirecto), produjo una disminución de la formación de PA en los núcleos provenientes de las retinas expuestas a la luz, mientras que no ocurrieron cambios significativos en la condición control en oscuridad.

Llamativamente, cuando se realizó la incubación de los núcleos aislados con la insulina (efecto directo), esta última indujo un incremento significativo en la formación de PA, tanto en la condición luz como en la condición control en oscuridad.

Por otro lado, la incubación con la insulina en la copa del ojo y luego en los núcleos aislados no produjo diferencias significativas con respecto al control en la condición luz, lo cual sugiere una compensación de los efectos debidos a la incubación de la copa del ojo con insulina (que produce una disminución de la actividad DAGK) y a la incubación de la FNF con insulina (que produce un aumento de la actividad DAGK).

Estos resultados demostraron que la insulina regula la actividad DAGK nuclear, y que ejerce sus efectos actuando tanto a nivel de la retina como también directamente sobre los núcleos de la FNF.

11.2.2 Acciones directas de la insulina sobre la actividad DAGK y la fosforilación de los polifosfoinosítidos en los núcleos de las células fotorreceptoras.

Los resultados presentados en la Figura 34 evidenciaron efectos directos de la insulina (0,2 μ M) sobre la actividad DAGK presente en la FNF. Para evaluar las vías que podrían estar involucradas en el aumento de la actividad DAGK nuclear producido por la incubación de los núcleos aislados con insulina se utilizaron el inhibidor de la PIP₂-PLC, U73122 10 μ M y el inhibidor de la vía de la PI3K, LY 10 μ M o sus respectivos vehículos. Cabe destacar que los núcleos aislados fueron resuspendidos en el buffer de ensayo (BAFI) conteniendo fluoruro de sodio, conocido protector de la fosforilación

de las serina/treonina (inhibidor de las serina/treonina fosfatasas), y fueron preincubados con vanadato como protector de las tirosinas fosforiladas.

En cuanto al ensayo enzimático, realizado con ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ como precursor, las FNF provenientes de las retinas bovinas expuestas a la luz o a la oscuridad fueron preincubadas con vanadato 0,2 mM y alguno de los inhibidores enzimáticos mencionados (U73122 o LY) o sus vehículos, durante 10 min a 37 °C, y luego fueron incubadas durante 10 min con insulina 0,2 μM o con su vehículo.

Los resultados obtenidos, expresados como porcentajes respecto a los respectivos controles (oscuridad y luz) con vanadato, son mostrados a continuación:

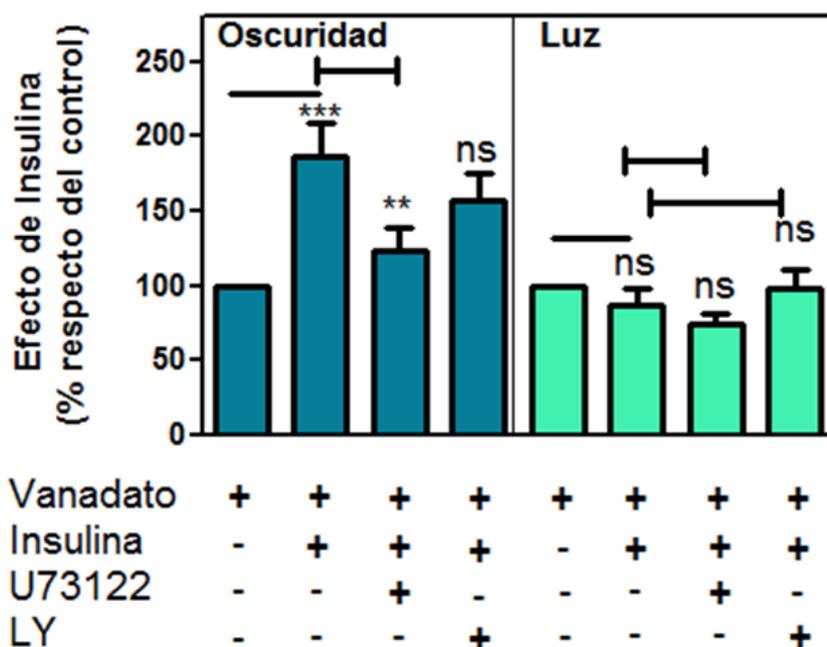


Figura 35. Analisis de los efectos de la insulina sobre la actividad DAGK y de las vías que median dichos efectos a nivel nuclear. Las FNF provenientes de las retinas expuestas a la luz o a la oscuridad fueron preincubadas durante 10 min con vanadato 0,2 mM y con los inhibidores enzimáticos U73122 10 μM o LY 10 μM , o con vanadato en presencia de los vehículos de los inhibidores enzimáticos antes mencionados, y fueron posteriormente incubadas con insulina 0,2 μM o con el vehículo de insulina, BSA/ agua, usando ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ (3 μCi por tubo), ATP 250 μM y DAG endógeno como sustratos de la reacción enzimática, durante 10 min a 37 °C. Los resultados fueron expresados como efectos de insulina (% respecto del control) considerando a los controles de las condiciones de luz y oscuridad como 100 %. ***p < 0,001, **p < 0,01.

Como se puede observar en la Figura 35, la incubación de la FNF proveniente de las retinas mantenidas en oscuridad con insulina 0,2 μ M produjo un aumento significativo (86 %) de la formación de PA a partir de DAG, mientras que cuando la FNF fue preincubada con U73122 10 μ M y fue posteriormente incubada con insulina, se produjo una disminución significativa de la actividad DAGK respecto de la incubación en ausencia del mismo (34 %). Por otro lado, la preincubación de la FNF con LY y la posterior incubación con insulina no produjo efectos significativos sobre la actividad DAGK nuclear en la oscuridad respecto del control (incubación con insulina). Estos resultados sugieren que los efectos directos de la insulina sobre la actividad DAGK nuclear en la oscuridad son dependientes de la activación previa de una PIP₂-PLC, mientras que no parecen tener relación con la activación de una PI3K.

Llamativamente, en los núcleos de las células fotorreceptoras provenientes de las retinas expuestas a la luz, la insulina pareció no ejercer efectos sobre la actividad DAGK, ni tampoco se detectaron modificaciones significativas por el empleo de los inhibidores analizados.

A continuación, se evaluaron los efectos de la insulina sobre la fosforilación de los polifosfoinosítidos en las FNF de las retinas expuestas a la luz o a la oscuridad. Además, se determinó el rol de las vías PIP₂-PLC y PI3K sobre dichos efectos. Las condiciones experimentales empleadas fueron las explicadas anteriormente (Figura 35).

Como se puede observar en la Figura 36, la fosforilación de los fosfoinosítidos nucleares considerando la sumatoria de las actividades fosfatidil inositol quinasa (PIK), fosfatidilinositol fosfato quinasa (PIP2K) y fosfatidilinositol bifosfato quinasa (PIP2K), dado que se contabiliza la radiomarcación en la totalidad de los fosfoinosítidos, fue estimulada en un 25 % por la exposición a la insulina de los núcleos obtenidos de las retinas mantenidas en oscuridad. Este estímulo disminuyó significativamente (33 %) solo ante la presencia de LY indicando que en la mediación del efecto estimulador de

la insulina participaría una PI3K, actividad que estaría incluida dentro de las actividades PIP2K.

El efecto estimulador de la insulina no fue observado en los núcleos obtenidos de las retinas expuestas a la luz.

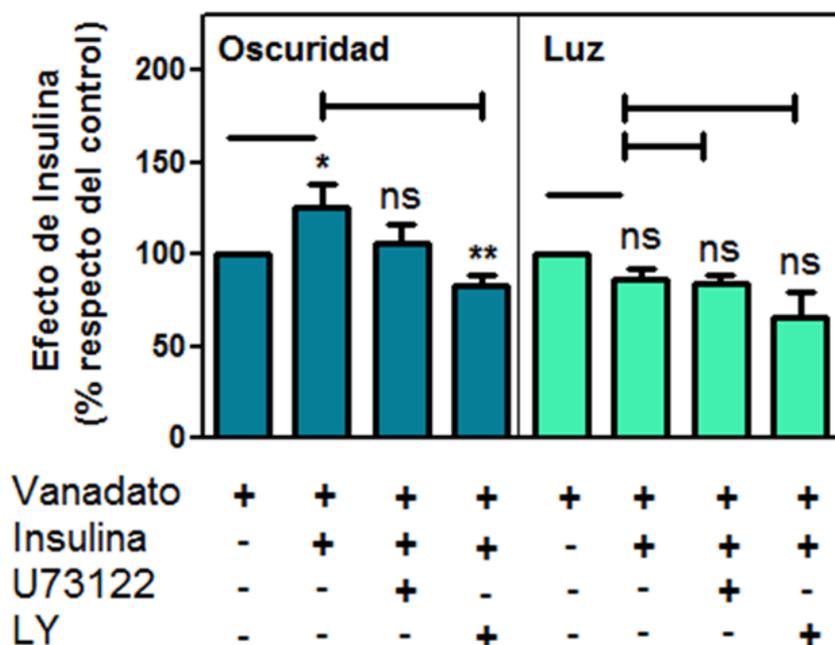


Figura 36. Evaluación de los efectos de la insulina sobre la fosforilación de los polifosfoinosítidos a nivel nuclear. Las FNF provenientes de las retinas expuestas a la luz o a la oscuridad fueron preincubadas durante 10 min con vanadato 0,2 mM y los inhibidores enzimáticos U73122 10 μ M o LY 10 μ M, o con el vanadato en presencia de los vehículos de los inhibidores enzimáticos antes mencionados, y fueron posteriormente incubadas con insulina 0,2 μ M o con el vehículo de la insulina, BSA/ agua, usando ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ (3 μ Ci por tubo), ATP 250 μ M y DAG endógeno como sustratos de la reacción enzimática, durante 10 min a 37 °C. Los resultados fueron expresados como efectos de insulina (% respecto del control) considerando a los controles de las condiciones de luz y oscuridad como 100 %. **p < 0,01, *p < 0,05.

El análisis de los valores basales de formación de los fosfoinosítidos comparando las experiencias en ausencia de Fluoruro de sodio (ambas en presencia de vanadato) nos indicó que mientras el fluoruro de sodio potencia fuertemente la formación de estos lípidos en oscuridad, este efecto es de escasa magnitud en los núcleos obtenidos de retinas expuestas a la luz. En la Figura 37 se presentan dichos resultados.

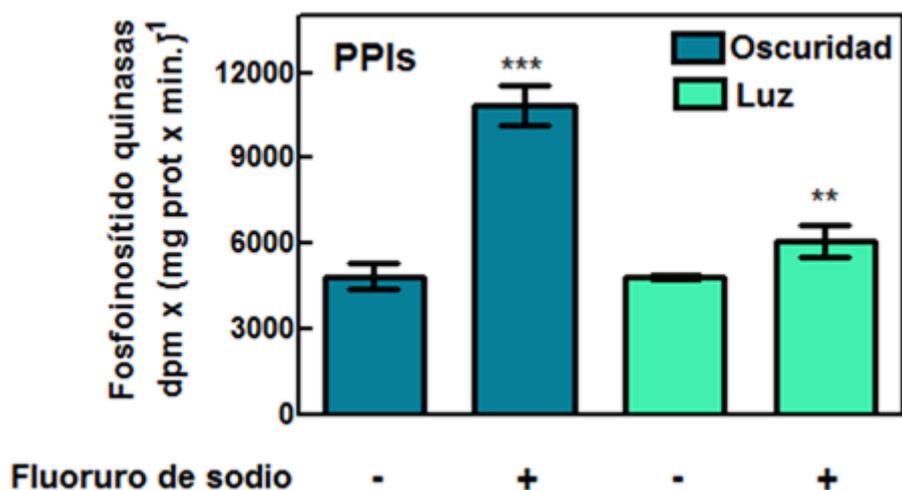


Figura 37. Efectos del fluoruro de sodio sobre las actividades fosfoinosítido quinasas totales en los núcleos de las células fotorreceptoras de las retinas bovinas mantenidas en oscuridad o expuestas a la luz. Las FNF provenientes de las retinas expuestas a la luz o a la oscuridad fueron resuspendidas en el buffer de ensayo (BAFI) conteniendo fluoruro de sodio o sin el mismo. Luego se realizó un ensayo enzimático para determinar las actividades de las fosfoinosítido quinasas totales usando ATP-[γ -³²P] (3 μ Ci por tubo), ATP 250 μ M y DAG endógeno como sustratos de la reacción enzimática, durante 10 min a 37 °C. Los resultados fueron expresados como Actividad de fosfoinosítido quinasas, dpm x (mg prot x min.)⁻¹. ***p < 0,001, **p < 0,01.

En función de los resultados presentados en la Figura 37, los cuáles demuestran que el fluoruro de sodio ejerce un efecto diferencial sobre los fosfoinosítidos en las FNF provenientes de las retinas expuestas a la luz y a la oscuridad, entendimos que su utilización podía generar una modulación de la actividad DAGK regulada por los fosfoinosítidos, independientemente de la acción de la insulina en estudio. Los datos de la bibliografía indican que, además de la inhibición de las Serina-Treonina fosfatasa, el fluoruro de sodio es un activador de las proteínas G heterotrímicas y de las proteínas G pequeñas (Vincent y col., 1998; Tatin y col., 2010). Datos previos de nuestro grupo de trabajo obtenidos del estudio de las acciones de la insulina en los sinaptosomas de la corteza cerebral mostraron que el fluoruro de sodio mimetiza el efecto de la insulina sobre la actividad DAGK, lo que fue atribuido a la modulación de la síntesis de los polifosfoinosítidos (Zulian y col., 2009). En función de estos datos, decidimos continuar el análisis de los efectos de la insulina sobre la actividad DAGK a nivel nuclear, en ausencia de esta sal.

II.2.3 Acciones directas de la insulina 0,8 μM sobre la actividad DAGK en los núcleos de las células fotorreceptoras.

Rajala y colaboradores detectaron importantes efectos de la insulina en cultivos de la retina utilizando una concentración de insulina 1 μM (Li y col., 2008; Rajala y col., 2009). Teniendo en cuenta estos datos, se evaluaron los efectos directos de una concentración mayor de insulina (0,8 μM) respecto de la utilizada en los experimentos anteriores (0,2 μM) sobre la actividad DAGK nuclear, en las FNF provenientes de las retinas expuestas a la luz o a la oscuridad. En el ensayo enzimático, las fracciones nucleares fueron preincubadas con vanadato 0,2 mM, y posteriormente incubadas con insulina 0,8 μM y ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ como sustrato radiomarcado, en ausencia de DAG exógeno y detergentes.

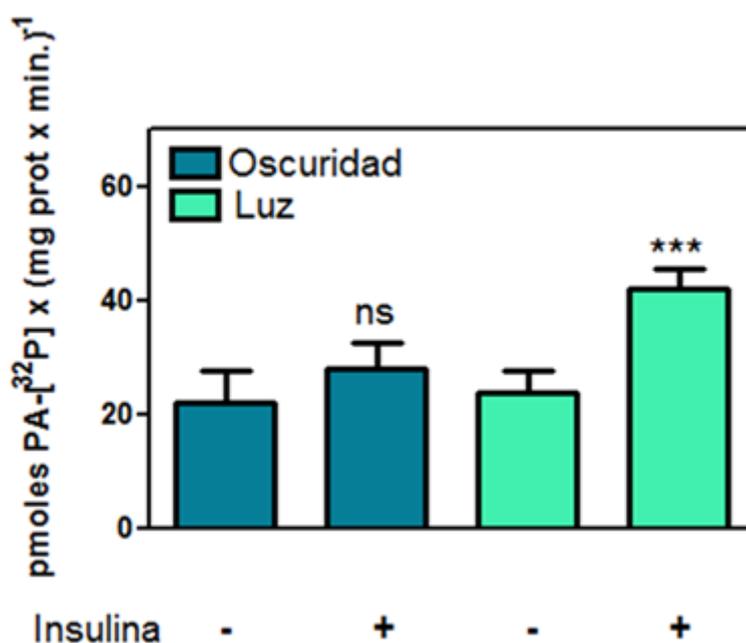


Figura 38. Efectos de la insulina 0,8 μM sobre la actividad DAGK en la FNF. Los núcleos de las células fotorreceptoras provenientes de las retinas expuestas a la luz o a la oscuridad fueron resuspendidos con BAFI en ausencia de fluoruro de sodio, y luego, las suspensiones nucleares fueron preincubadas durante 10 min con vanadato 0,2 mM, y posteriormente incubadas con insulina 0,8 μM , usando ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ (3 μCi por tubo), ATP 250 μM y DAG endógeno como sustratos de la reacción enzimática, durante 10 min a 37 °C. Los resultados fueron expresados como pmoles PA- ^{32}P] x (mg prot x min.) $^{-1}$. ***p < 0,001.

Cuando las FNF fueron incubadas con insulina 0,8 μM se produjo un incremento significativo de la formación de PA en la condición de luz, pero no ocurrieron cambios significativos de la actividad DAGK en la condición control en oscuridad (Figura 38). Estos resultados sugieren que los efectos de la insulina sobre la actividad DAGK nuclear son mediados por la luz. Es decir, la exposición previa de las retinas a la luz condiciona el estado de sensibilidad de los núcleos a la insulina. Es importante mencionar que en este protocolo, además de utilizar insulina 0,8 μM , los núcleos aislados fueron preincubados con vanadato, condición que según las experiencias comparativas realizadas (Fig. 40), genera un estado basal de DAGK “activado”.

A los fines de comparar los efectos de distintas concentraciones de insulina sobre la actividad DAGK nuclear y teniendo en cuenta que en los estudios realizados en presencia de insulina 0,2 μM no se realizó una preincubación con vanadato, si no que ambos fueron incorporados en el ensayo en forma conjunta, a continuación se evaluaron los efectos de la incubación de las FNF con insulina 0,8 μM , realizando un ensayo enzimático en condiciones similares a las descritas en la Figura 34.

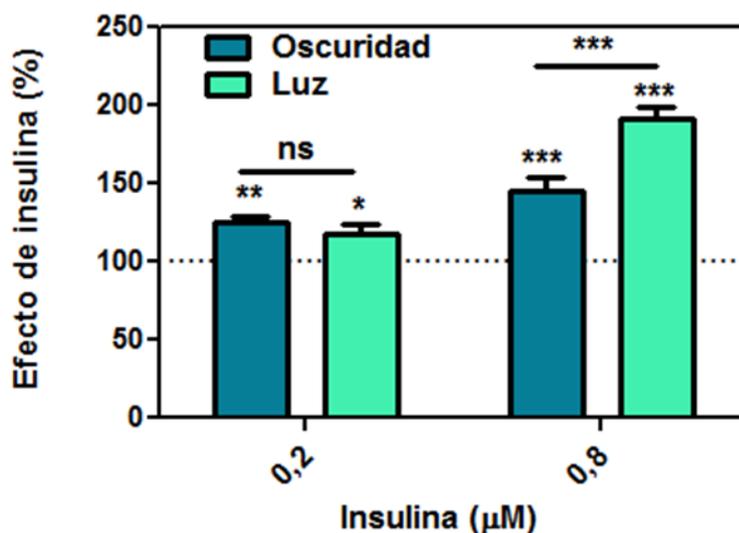


Figura 39. Efecto de distintas concentraciones de insulina sobre la actividad DAGK en la FNF. El siguiente gráfico fue elaborado con los datos mostrados en la Figuras 34 y los resultados obtenidos al analizar la actividad DAGK nuclear por efecto de insulina 0,8 μM en un protocolo donde el vanadato fue incorporado junto con la insulina (sin preincubación). Los asteriscos indican las diferencias respecto al control en ausencia de insulina. Las líneas horizontales indican la comparación entre las condiciones luz y oscuridad para cada concentración. ***p < 0,001, **p < 0,01, *p < 0,05.

Como se puede observar en la Figura 39, la incubación de la FNF con una concentración mayor de insulina (0,8 μM con respecto a 0,2 μM), indujo un incremento mayor en la formación de PA.

Aunque una concentración inferior de insulina (0,2 μM) ejerció efectos significativos sobre la actividad DAGK en las FNF provenientes de ambas condiciones (luz y oscuridad), no se observaron diferencias entre las condiciones luz y oscuridad. Sin embargo, frente a la incubación de los núcleos aislados con insulina 0,8 μM , la exposición de las retinas a la luz generó una potenciación de la respuesta de la DAGK nuclear.

Estos últimos hallazgos abrieron interesantes expectativas respecto al estudio de la presencia del receptor de insulina en los núcleos de las células fotorreceptoras así como de la influencia de la luz en este fenómeno.

11.2.4 Potenciación por vanadato de los efectos de la insulina sobre la actividad DAGK y la fosforilación de los polifosfoinosítidos en la FNF.

A continuación nos propusimos analizar las diferencias halladas en la actividad DAGK nuclear cuando las retinas bovinas o los núcleos aislados son incubados con vanadato 0,2 mM previamente a la incubación de las FNF con insulina. Esta exposición previa revelaría si en la condición basal es crítica la fosforilación en los residuos de tirosina de las proteínas nucleares, tales como el receptor de insulina.

Para realizar dicho análisis, los copas de los ojos bovinos fueron preincubadas durante 15 min con vanadato 0,2 mM en medio Ames, o con medio Ames únicamente (condición control) bajo la luz de una lámpara roja, y a continuación fueron expuestas a la luz o mantenidas en oscuridad durante 30 min. Luego se realizó el aislamiento de las FNF respectivas como fue detallado en materiales y métodos. En el ensayo enzimático, las FNF fueron preincubadas con vanadato 0,2 mM o su vehículo (condición control), y luego fueron incubadas con insulina 0,8 μM ó con el vehículo de

la insulina (BSA/ agua) y ATP-[γ - 32 P] como sustrato radiomarcado, en ausencia de DAG exógeno y de detergentes.

Como se puede observar en la figura 40 a) (oscuridad), en las condiciones en que las retinas bovinas no fueron preincubadas con vanadato (1^o y 2^o columna), la preincubación de los núcleos aislados con vanadato seguida de la incubación con insulina ejerció un efecto estimulador sobre la actividad DAGK nuclear respecto a la condición control (45 %). También se produjo un incremento significativo de la actividad DAGK en la FNF cuando las retinas bovinas y los núcleos aislados fueron preincubados con vanadato, en ausencia de insulina. Cuando se realizó la preincubación con vanadato (a nivel de retina y a nivel nuclear) y la posterior incubación con insulina, se observó una suma de sus efectos (90 %). Estos resultados sugieren que en la condición control (oscuridad) el vanadato no solo exacerba los efectos estimuladores ejercidos por la insulina, si no que además es capaz de producir “per se” un incremento de la actividad DAGK nuclear.

Los efectos estimuladores de la insulina sobre la actividad DAGK nuclear resultaron más significativos en la condición de luz (Figura 40 b) que en la condición de oscuridad (139 %). En la condición de luz, la preincubación de las retinas bovinas y los núcleos aislados con vanadato en ausencia de insulina no generó un estímulo significativo de la actividad DAGK. Sin embargo, cuando la FNF fue preincubada con vanadato, la insulina indujo un estímulo del 162 % en la actividad DAGK. Este resultado sugiere que los efectos estimuladores de vanadato en ausencia de insulina exógena, observados en oscuridad podrían evidenciar la presencia de una población del receptor de insulina activado por condiciones basales de luz, que se pueden atribuir al modelo empleado.

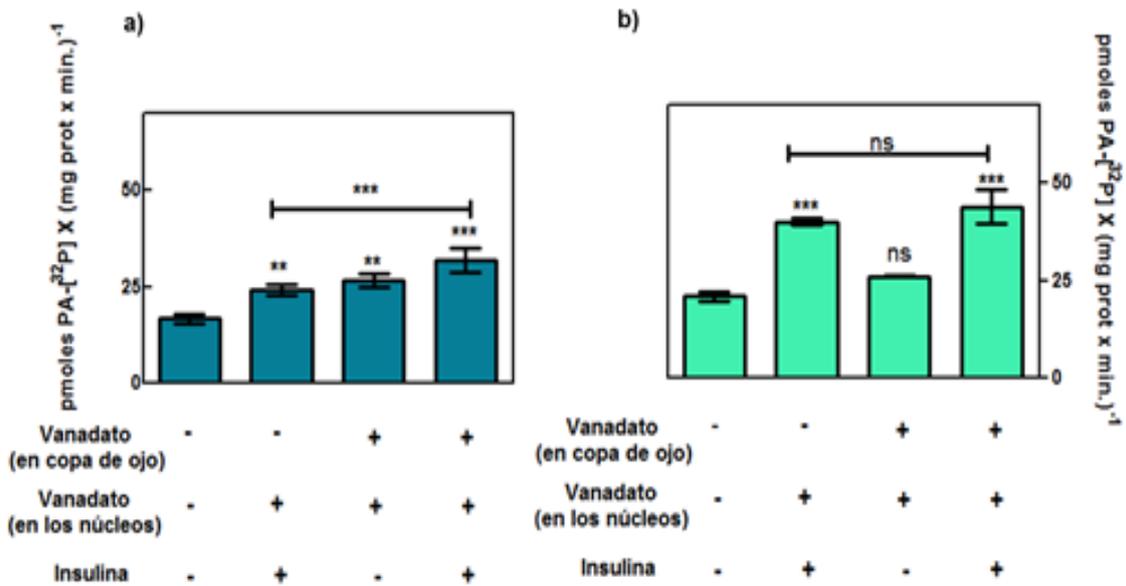


Figura 40. Efectos de vanadato 0,2 mM sobre la actividad DAGK en la FNF. Las copas de los ojos bovinos fueron preincubadas con vanadato 0,2 mM o con su vehículo (condición control) en medio Ames oxigenado (O_2 95 %, CO_2 5 %), durante 15 min bajo la luz de una lámpara roja. Luego, fueron expuestas a la oscuridad (a) o a la luz (b) durante 30 min. Las FNF provenientes de las retinas expuestas a la luz o a la oscuridad fueron preincubadas durante 10 min con vanadato 0,2 mM o con su vehículo, y posteriormente fueron incubadas con insulina 0,2 μ M o con su vehículo (BSA/agua) usando ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ (3 μ Ci por tubo), ATP 250 μ M y DAG endógeno como sustratos de la reacción enzimática, durante 10 min a 37 °C. Los resultados fueron expresados como pmoles PA- $[\text{}^{32}\text{P}]$ x (mg prot x min.) $^{-1}$. ***p < 0,001, **p < 0,01.

A continuación, se realizó la cuantificación de la fosforilación de los polifosfoinosítidos de la FNF bajo las condiciones de ensayo antes explicadas.

En los resultados mostrados en la Figura 41 se pueden observar efectos muy similares a lo que ocurre con la formación de PA (Figura 40), es decir, la preincubación con vanadato se suma a los efectos de la insulina en la FNF, produciendo un estímulo mayor de la actividad de las fosfoinosítidos quinasas nucleares respecto de la condición sin vanadato. Además, la incubación de las retinas bovinas y de los núcleos aislados con vanadato produjo una exacerbación de los efectos estimulatorios de la insulina sobre la actividad de las fosfoinosítido quinasas respecto de la condición en que fue realizada únicamente la preincubación de los núcleos aislados con vanadato. Cabe destacar que dichos efectos resultaron también más significativos en la

condición de luz que en la condición control (oscuridad) y que además fueron superiores a los efectos estimulatorios observados sobre la actividad DAGK nuclear.

Ambas figuras sugieren que los efectos de vanadato son atribuibles a la protección de la fosforilación en tirosina de un receptor de insulina nuclear, receptor activable por insulina que regula a las DAGK y a las fosfoinosítido quinasas. Por otra parte, la presencia de dicho receptor en los núcleos podría ser regulada por la luz

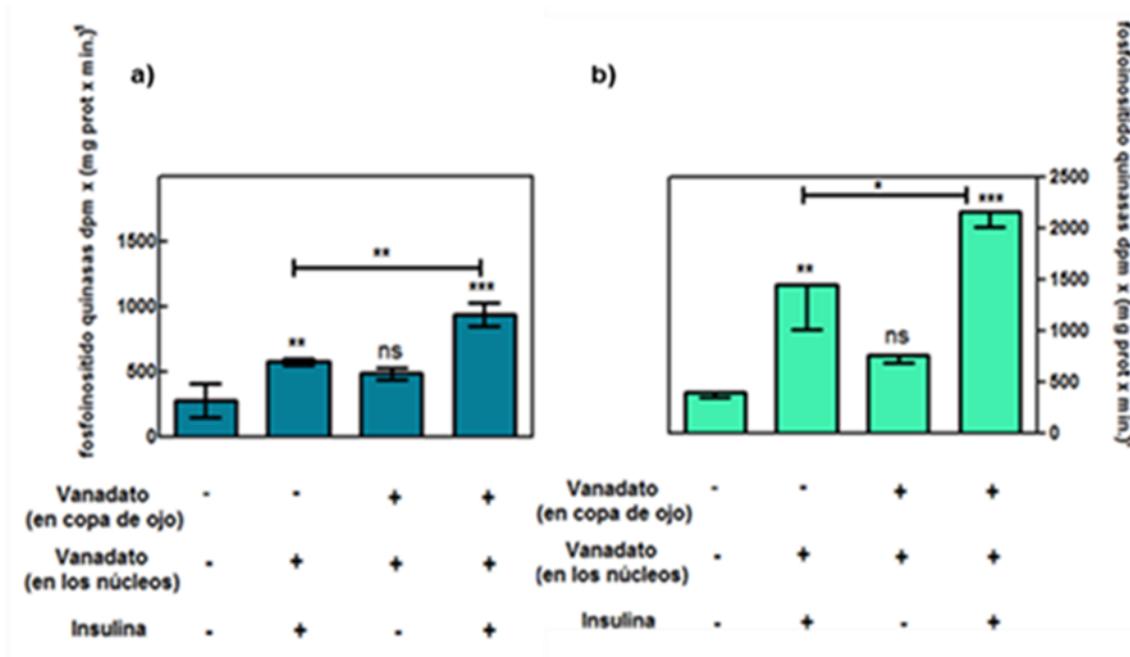


Figura 41. Efectos de vanadato 0,2 mM sobre la fosforilación de los polifosfoinosítidos en la FNF.

Las copas de los ojos bovinos fueron preincubadas con vanadato 0,2 mM o con su vehículo (condición control) en medio Ames oxigenado (O₂ 95 %, CO₂ 5 %), durante 15 min bajo la luz de una lámpara roja. Luego, fueron expuestas a a la oscuridad (a) o a la luz (b) durante 30 min. Las FNF provenientes de las retinas expuestas a la luz o a la oscuridad fueron preincubadas durante 10 min con vanadato 0,2 mM o con su vehículo, y posteriormente fueron incubadas con insulina 0,2 μM o con su vehículo (BSA/agua) usando ATP-[γ-³²P] (3 μCi por tubo), ATP 250 μM y DAG endógeno como sustratos de la reacción enzimática, durante 10 min a 37 °C. Los resultados fueron expresados como la actividad de las fosfoinosítido quinasas, dpm x (mg prot x min.)⁻¹. ***p < 0,001, **p < 0,01, *p < 0,05.

II.3 ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DEL RECEPTOR DE INSULINA EN LOS NÚCLEOS DE LA RETINA.

Nuestros resultados demostraron que la insulina ejerce efectos directos a nivel nuclear sobre la actividad DAGK. Estas observaciones nos condujeron a considerar la

posibilidad de que el receptor de insulina estuviera presente en los núcleos de las células fotorreceptoras de la retina bovina.

Con el fin de determinar la presencia del RI en la FNF, así como también en la FNR, se llevó a cabo la técnica de WB utilizando los anticuerpos primarios y secundarios correspondientes para detectar al RI en ambas fracciones nucleares.

Como se muestra en la Figura 42, el RI fue hallado en ambas fracciones nucleares, siendo mayor su contenido en la fracción nuclear de la retina (constituida por los núcleos de todos los tipos celulares de la retina). Esto significa que el RI está presente no solo en la FNF si no también en los núcleos de otros tipos celulares de la retina.

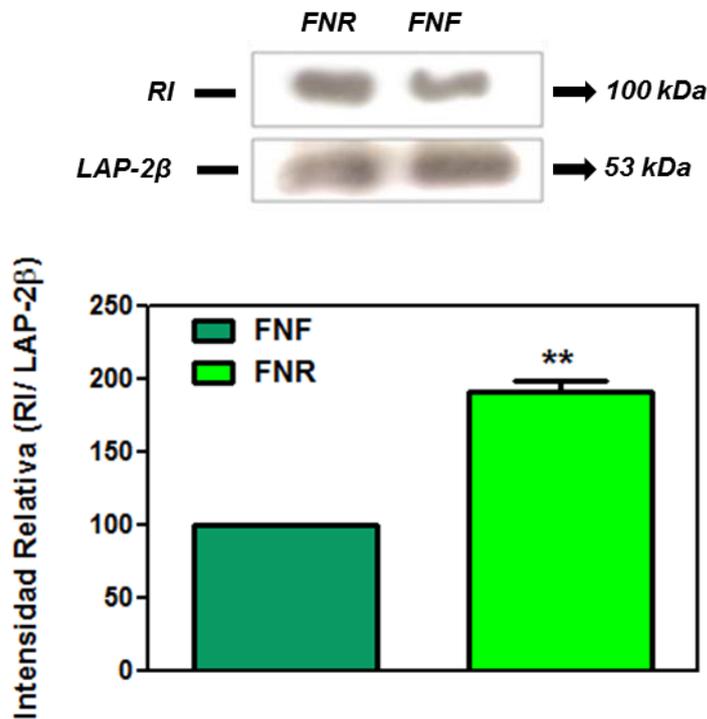


Figura 42. Análisis de la presencia del RI en la FNR y en la FNF. Las proteínas de la FNR y de la FNF (40 µg) se resolvieron por SDS-PAGE al 10 % y se transfirieron a una membrana de PVDF. Detección de RI: Anticuerpo primario (monoclonal de conejo, dilución 1: 500, v/v) toda la noche a 4 °C, y Anticuerpo secundario anti-conejo (1: 2.000, v/v) 2 h a temperatura ambiente. Los resultados fueron expresados como intensidad relativa de (RI/LAP-2β).

II.4 EFECTOS DE LA LUZ SOBRE EL CONTENIDO DEL RECEPTOR DE INSULINA EN LOS NÚCLEOS DE LAS CÉLULAS FOTORRECEPTORAS.

Los trabajos de Rajala y colaboradores, realizados en la retina bovina *in vitro*, sostienen que la exposición de las copas de los ojos a la luz es capaz de activar a la PI3K, (a sus subunidades p85 y p110), presente en los segmentos externos de los bastones de la retina. Estos autores también demostraron que se observa un efecto similar en un modelo de rata en cautiverio *in vivo*, en el cual la luz produce la fosforilación del RI en sus residuos de tirosina en los segmentos externos de los bastones. Dado que nuestros hallazgos confirmaron la presencia del RI en la FNF, decidimos indagar si la luz modifica el contenido del RI en dicha fracción nuclear. Para ello se realizaron estudios de WB, empleando los anticuerpos primarios y secundarios correspondientes para su detección (Figura 43).

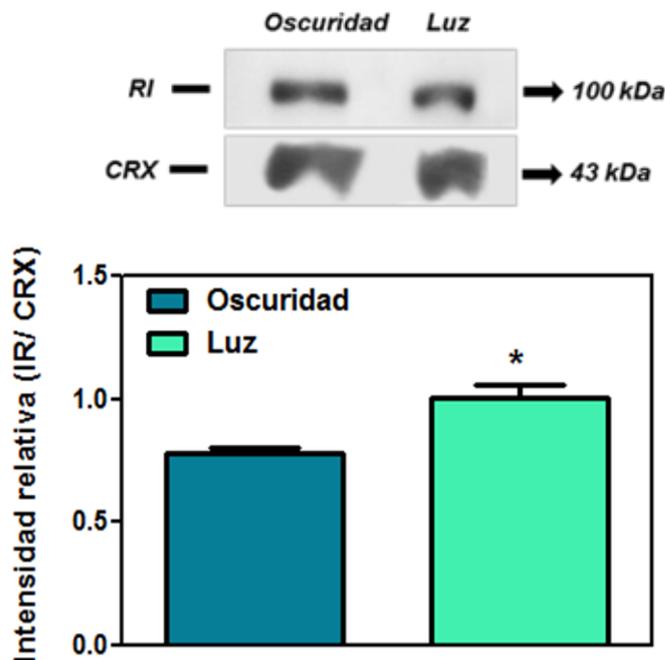


Figura 43. Efectos de la luz sobre el contenido del RI en la FNF. Las proteínas de la FNF (40 µg) de las retinas expuestas a la luz o a la oscuridad se resolvieron por SDS-PAGE al 10 % y se transfirieron a una membrana de PVDF. La detección del RI en ambas condiciones se realizó siguiendo el procedimiento descrito en la Figura 42. *p < 0,05.

Los resultados de WB confirmaron la presencia del RI en los núcleos de las células fotorreceptoras en ambas condiciones experimentales. Estos además evidenciaron que el contenido del RI es mayor en los núcleos provenientes de las retinas expuestas a la luz que en aquellos provenientes de las retinas mantenidas en oscuridad (Figura 43).

Para corroborar los datos obtenidos por WB, se investigó la presencia del RI en la FNF y la modulación de su contenido por la acción de la luz mediante inmunofluorescencia, utilizando los anticuerpos adecuados para su detección, y la sonda fluorescente TOPRO como marcador nuclear (Figura 44).

Los resultados obtenidos por microscopía confocal fueron coincidentes con los datos obtenidos por WB. En las imágenes de IF se pudo observar una señal fluorescente correspondiente a la presencia del receptor de insulina en la FNF. Esta señal fluorescente fue mayor en los núcleos de las retinas expuestas a la luz que en aquellos provenientes de las retinas mantenidas en oscuridad. Estos resultados podrían indicar que la luz promueve una translocación del RI desde la membrana plasmática hacia el núcleo, causante de un mayor contenido del RI en los núcleos de las células fotorreceptoras cuyas retinas fueron expuestas a la luz.

:

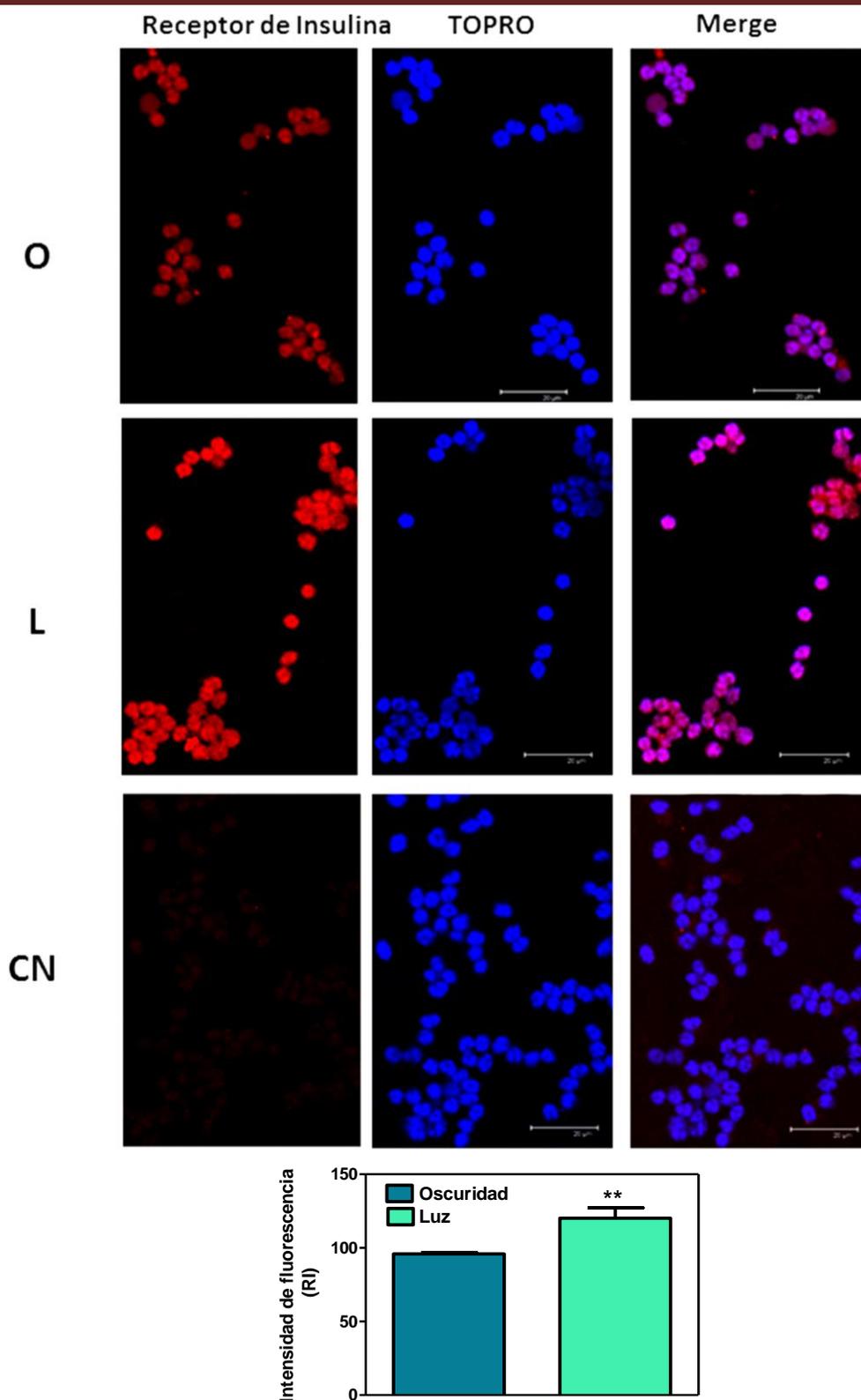


Figura 44. Efectos de la luz sobre el contenido del RI en la FNF. Las suspensiones de la FNF de retinas expuestas a la luz o a la oscuridad fueron tratadas como fue descrito en materiales y métodos e incubadas con el anticuerpo primario RI (1: 50, v/v) toda la noche a 4 °C, y el anticuerpo secundario Alexa fluor (1: 2.000, v/v) 2 h a temperatura ambiente. A continuación, fueron incubadas con la sonda fluorescente TOPRO (1: 1.000, v/v), 15 min a temperatura ambiente. Las muestras fueron visualizadas por microscopía confocal. O: Oscuridad; L: Luz; CN: Control Negativo. ** $p < 0,01$.

II.5 EFECTOS DE LA INSULINA SOBRE EL CONTENIDO DEL RECEPTOR DE INSULINA EN LA FNF DE LAS RETINAS EXPUESTAS A LA LUZ.

Diversos estudios han demostrado que los receptores del tipo tirosina quinasa (RTK) son capaces de translocar al núcleo de las células en respuesta a ciertos estímulos, principalmente sus ligandos (Lin y col., 2001; Gomes y col., 2008; Reilly y Maher, 2001). Nuestros resultados previos sugieren que el receptor de insulina podría translocar al núcleo de las células fotorreceptoras en respuesta a la exposición de las retinas bovinas a la luz. A continuación nos propusimos analizar si la insulina, el ligando natural del receptor de insulina, es capaz de potenciar los efectos de la luz respecto a la translocación del receptor de insulina al núcleo de las células fotorreceptoras.

Para ello, las copas de los ojos bovinos fueron preincubadas con insulina 0,8 μM o con su vehículo, en presencia de vanadato 0,2 mM, inhibidor de las tirosina fosfatasa, y luego fueron expuestas a la luz durante 30 min. Luego se realizaron ensayos de WB para determinar el contenido del RI en las FNF (Figura 45 a). Por otra parte, los núcleos aislados provenientes de retinas expuestas a la luz, fueron preincubados con vanadato 0,2 mM durante 10 min, e incubados con insulina 0,8 μM durante 10 min a 37 °C, y fue determinado el contenido del RI total en la FNF (Figura 45 b).

Como se puede observar en la Figura 45 a), la incubación de las copas de los ojos bovinos con insulina 0,8 μM previamente a la exposición de las retinas a la luz produjo un aumento (165 %) en el contenido del receptor de insulina en los núcleos de las células fotorreceptoras de la retina bovina. Sin embargo, la incubación de los núcleos aislados de las células fotorreceptoras con insulina no indujo cambios significativos en el contenido del mismo (Figura 45 b). Estos resultados sugieren que la insulina podría promover la translocación del receptor de insulina a los núcleos de las células fotorreceptoras, y potenciar así los efectos debidos a la exposición de las retinas bovinas a la luz.

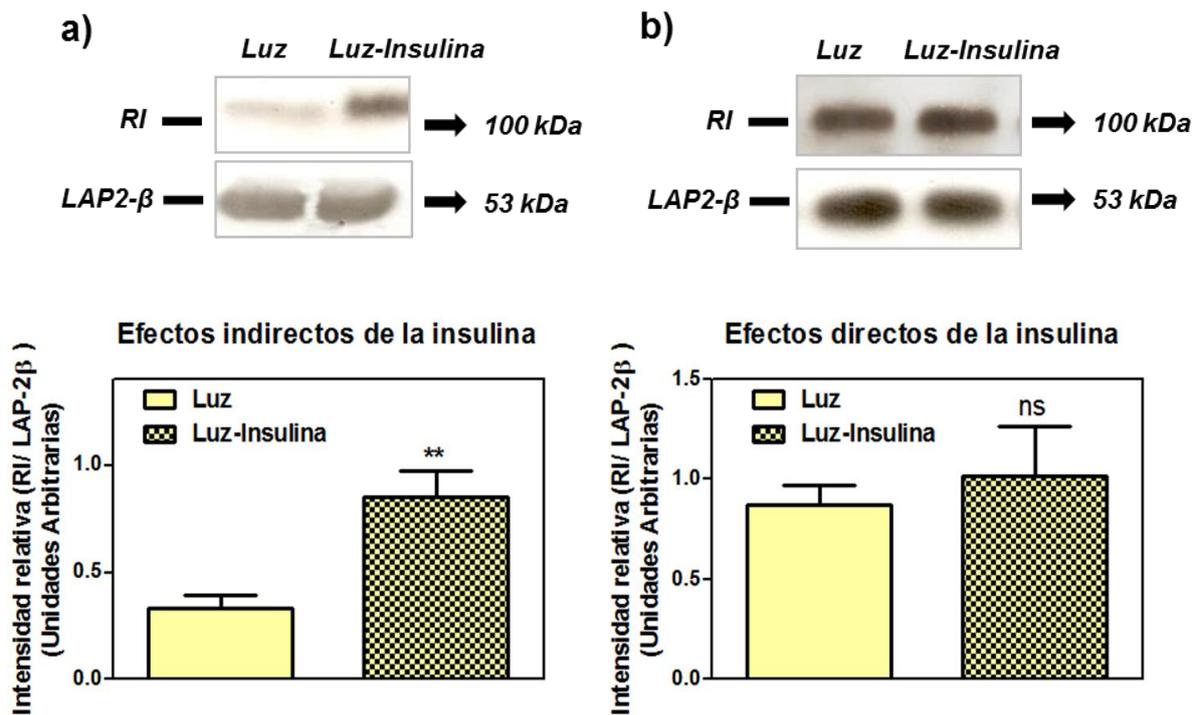


Figura 45. Efectos de la insulina sobre el contenido del Receptor de insulina en las FNF provenientes de las retinas expuestas a la luz. **a)** Las copas de los ojos bovinos fueron preincubadas con insulina 0,8 μ M y vanadato 0,2 mM o con su vehículo (condición control) en medio Ames oxigenado (O_2 95 %, CO_2 5 %), durante 15 min bajo la luz de una lámpara roja. Luego, fueron expuestas a la luz durante 30 min, y la FNF fue aislada como fue descrito en materiales y métodos. Las proteínas de la FNF (40 μ g) se resolvieron por SDS-PAGE al 10 % y se transfirieron a una membrana de PVDF. Detección de RI: anticuerpo primario (monoclonal de conejo, dilución 1: 500, v/v) toda la noche a 4 °C, y Anticuerpo secundario anti-conejo (1: 2.000, v/v) 2 h a temperatura ambiente. Los resultados fueron expresados como intensidad relativa de (RI/LAP-2 β). **b)** Las copas de los ojos bovinos fueron expuestas a la luz durante 30 min, y la FNF fue aislada siguiendo el procedimiento descrito en materiales y métodos. Los núcleos aislados fueron preincubados en presencia de vanadato 0,2 mM durante 10 min y luego fueron incubados con insulina 0,8 μ M o su vehículo (BSA/agua) durante 10 min a 37 °C. Las muestras fueron tratadas para su análisis por WB, empleando los anticuerpos descritos en a). **p < 0,01.

II.6 EFECTOS DE LA INSULINA SOBRE EL CONTENIDO Y EL ESTADO DE FOSFORILACIÓN DE ERK1/2 EN LAS FNF DE LAS RETINAS BOVINAS EXPUESTAS A LA LUZ.

Nuestros resultados previos demostraron que la exposición de las retinas bovinas a la luz induce la translocación de ERK en su estado fosforilado (activado) a los núcleos de las células fotorreceptoras (Figura 32). Teniendo en cuenta que la vía de las MAPK es

una de las principales vías activadas por la insulina, y que nuestros resultados demostraron la presencia del receptor de insulina a nivel nuclear en los núcleos de las células fotorreceptoras de la retina bovina, nos propusimos evaluar si la insulina es capaz de activar la vía de señalización de las MAPK en la FNF proveniente de las retinas expuestas a la luz. Para ello, los núcleos aislados provenientes de las retinas expuestas a la luz fueron preincubados con vanadato 0,2 mM durante 10 min e incubados con insulina 0,8 μ M o con su vehículo (BSA/agua) (condición control) durante 10 min a 37 °C. Luego se realizaron ensayos de WB para determinar el contenido de de ERK1/2 y de pERK1/2 (estado activo) en la FNF.

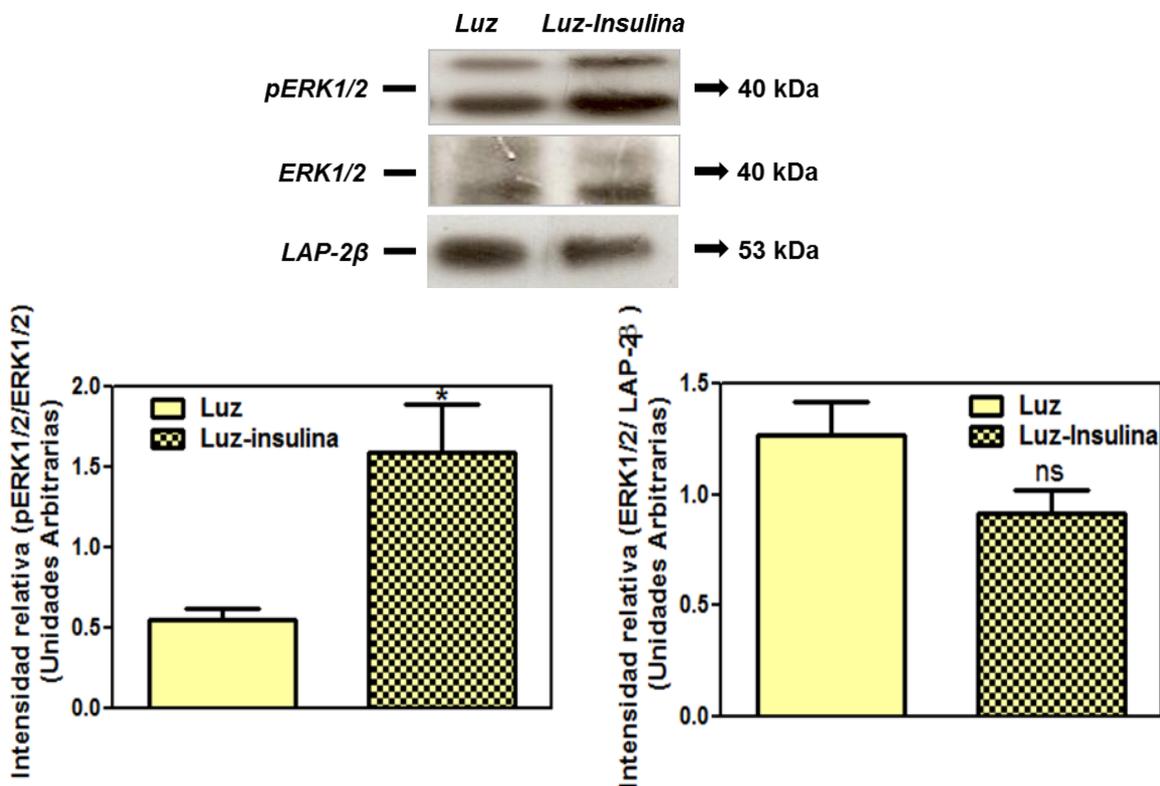


Figura 46. Efectos de la insulina sobre la vía de señalización de las MAPK en la FNF proveniente de las retinas expuestas a la luz. Las copas de los ojos bovinos fueron expuestas a la luz durante 30 min, y a continuación la FNF fue aislada siguiendo el procedimiento descrito en materiales y métodos. Los núcleos aislados fueron preincubados en presencia de vanadato 0,2 mM durante 10 min y luego fueron incubados con insulina 0,8 μ M o su vehículo (BSA/agua) durante 10 min a 37 °C. Las muestras fueron tratadas para su análisis por WB, empleando los anticuerpos adecuados. Detección de ERK total y pERK: incubación con los anticuerpos primarios de conejo anti-pERK (1: 1.000, v/v), anti-ERK (1: 1.000, v/v) toda la noche a 4 °C, y con el anticuerpo secundario anti-conejo (1: 1.000, v/v) durante dos horas a temperatura ambiente. Detección de LAP-2 β : Incubación con el anticuerpo primario de ratón anti-LAP 2- β (1: 2000, v/v) durante 2 hs y con el anticuerpo secundario anti-ratón (1: 2000, v/v) durante 2 hs. Los resultados fueron expresados como intensidad relativa pERK1/2/ERK1/2 y ERK1/2/ LAP-2 β . *p < 0,05.

Como se puede observar en la Figura 46, la incubación de los núcleos aislados con insulina produjo un incremento (200 %) en el contenido de ERK1/2 fosforilado (pERK1/2) en la FNF, sin cambios significativos en el contenido de ERK1/2 total. Estos resultados sugieren que la insulina induce la activación de ERK1/2 en la FNF, lo que resulta en un aumento de su forma fosforilada. Estos efectos podrían ser mediados por el receptor de insulina nuclear.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DEL CAPÍTULO I

Las enzimas que intervienen en la síntesis, degradación y recambio de los lípidos cumplen roles esenciales en la célula dado que no solo regulan los niveles de estos importantes constituyentes estructurales sino que además, en algunos casos, actúan como participantes en la generación de segundos mensajeros lipídicos ó en su regulación.

En los segmentos externos de los bastones de las células fotorreceptoras (ROS) se han identificado una gran variedad de enzimas cuya actividad está relacionada con el recambio de los fosfolípidos. Si bien la síntesis *de novo* de dichas moléculas tiene lugar en el segmento interno, los fosfolípidos, integrantes de las membranas discales y de la membrana plasmática, tienen una vida media menor que la de las proteínas presentes en los ROS. Este hecho, indicativo de que los ROS poseen la maquinaria necesaria para participar en la remodelación de los fosfolípidos, fue confirmado varios años después. Nuestro grupo de investigación no solo ha participado en la caracterización de varias actividades enzimáticas de tipo fosfolipásica, lípido fosfatasa, lipasa, transferasa y quinasa sino que también ha reportado que varias de ellas son reguladas por la luz (Giusto y col., 2010). La estimulación lumínica produce la inhibición de la vía PLD-PAPasa y la estimulación de la actividad DAGK, enzimas participantes en la remodelación de los glicerolípidos. Esta modulación negativa y positiva respectivamente implica, en el caso de la vía PLD-PAPasa, la movilización de RhoA (activador de la enzima PLD) desde los segmentos externos hacia los segmentos internos de las células fotorreceptoras (Salvador y Giusto, 2006) y la movilización en sentido contrario de la DAGK ϵ (Natalini y col., 2013). Las modificaciones en la distribución de un activador de la PLD (RhoA) y de la DAGK ϵ inducidas por la luz, que explican la menor y mayor actividad de las enzimas mencionadas en los ROS, transcurren en paralelo a la translocación de las proteínas participantes en la fototransducción, como lo son la transducina, la arrestina y la

recoverina, quiénes a través de esta movilización estarían involucradas en el proceso de adaptación a la luz.

El propósito del capítulo I de esta tesis doctoral fue evaluar si la estimulación lumínica, que dispara el proceso de la fototransducción e inicia otras vías de señalización asociadas en los ROS, produce cambios en la actividad DAGK a nivel nuclear en las células fotorreceptoras de la retina bovina.

Muchos grupos de investigación han reportado que existen vías de señalización celular dependientes de lípidos a nivel nuclear, que controlan funciones biológicas críticas tales como la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis (Cocco y col., 2001; D'Santos y col., 2000; D'Santos y col., 1998; Martelli y col., 2004). La localización nuclear y subnuclear así como las funciones de las diferentes isoformas de DAGK han sido descritas en diferentes tipos celulares (Martelli y col., 2006). Sin embargo, esta es la primera evidencia de la presencia y la actividad de varias isoformas de DAGK en la fracción nuclear de las células fotorreceptoras de la retina bovina.

Los resultados iniciales obtenidos en los núcleos de la retina bovina nos permitieron demostrar que varias isoformas de DAGK están presentes a nivel nuclear y que transforman activamente el sustrato DAG en PA en los núcleos de la retina bovina (Figuras 2, 3 y 4).

Siendo nuestro interés la evaluación de la presencia y de la actividad DAGK en los núcleos de las células fotorreceptoras, para relacionar los efectos de la estimulación lumínica de la retina con potenciales efectos a nivel nuclear, un primer objetivo fue obtener una población de núcleos proveniente de dicho tipo celular.

El protocolo de aislamiento de los núcleos propuesto en esta tesis, denominado "método nuevo", nos permitió obtener una fracción altamente enriquecida en los núcleos de las células fotorreceptoras (FNF). Nuestros resultados (tinción nuclear con yoduro de Propidio, MET y WB) indicaron que la aplicación del "método nuevo"

incrementa significativamente el porcentaje de los núcleos de los fotorreceptores obtenidos respecto del “método tradicional” (Figuras 6, 7 y 8).

Aunque resultaba evidente que los protocolos de obtención de núcleos nos permitieron obtener fracciones nucleares purificadas (dado que solo se advierte una escasa proporción de vesículas en las imágenes obtenidas por IF y MET), el empleo de marcadores de otras organelas celulares, tales como calnexina (marcador del retículo endoplasmático) y rodopsina (marcador de los segmentos externos de las células fotorreceptoras) nos permitió demostrar también por WB que la FNF está altamente purificada (Figura 9).

Usando dos precursores radioactivos diferentes (DAG- ^3H] y ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$), se demostró una actividad DAGK en la FNF. Los primeros experimentos realizados fueron diseñados con la finalidad de hallar las condiciones óptimas de ensayo para medir la generación de PA- ^{32}P], a partir de ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$. En primer lugar se realizaron curvas de cinética destinadas a identificar los tiempos y las concentraciones de proteínas en las que la actividad enzimática resulta lineal, así como también las concentraciones máximas de sustratos (DAG y ATP) que deben ser utilizadas en el ensayo enzimático. Como se describió en las Figuras 11 y 12, la síntesis de PA a partir del sustrato lipídico exógeno DOG, usando ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ como sustrato radioactivo, fue lineal en función del tiempo y de la concentración de proteínas máximos utilizados en los respectivos ensayos. También fueron determinadas las concentraciones de DOG y ATP que producen la saturación de la actividad DAGK (Figuras 13 y 15).

Aunque la DAGK es una enzima bisustrato, lo que hace compleja la valoración de las constantes cinéticas respectivas, la utilización de concentraciones máximas de cada cosustrato en los ensayos respectivos permitió la determinación de las K_m^{DOG} y K_m^{ATP} aparentes, así como los valores de V_{max} aparentes (Figuras 14 y 16). Es necesario mencionar que estos valores, de orden micromolar, probablemente responden a varias isoformas.

En el caso de varias enzimas que participan de la transformación de los lípidos, la utilización de detergentes en la medición de su actividad favorece la accesibilidad al sustrato y aumenta la disponibilidad de sus sitios activos, haciendo posible la medición optimizada de estas actividades enzimáticas. En cuanto a las DAGK, es conocida su dependencia por fosfolípidos ó detergentes (Epanand y col., 2007; Fanani y col., 2004). Estos hallazgos han permitido demostrar cierta selectividad de las diferentes isoformas por determinados detergentes. Por otro lado, también es conocido que mientras que la mayoría de las isoformas de DAGK utiliza indistintamente DAG de diferente composición de acilos, algunas de ellas como la DAGK ζ y la DAGK ϵ tienen preferencia de sustratos (Thirugnanam y col., 2001). Como se muestra en las Figuras 17 y 18, al utilizar dos detergentes no iónicos (Tritón X-100 y OG) y el detergente iónico DCNa, en presencia de dos sustratos lipídicos exógenos, DOG y SAG, se hallaron efectos dependientes de los detergentes y otros dependientes del tipo de sustrato. Esta evaluación fue posible al emplear dos tipos de controles, medios sin detergentes (con DOG ó SAG), y medios con detergentes, pero en ausencia de los sustratos exógenos. En presencia de DOG, todos los detergentes utilizados en el ensayo enzimático redujeron significativamente la actividad DAGK respecto de la condición sin detergente, mientras que en presencia de SAG, ambos detergentes no iónicos aumentaron considerablemente la formación de PA. Por su parte, el DCNa redujo la actividad DAGK respecto de la condición sin detergente. Los resultados obtenidos con los detergentes iónicos y no iónicos, en presencia de diferentes sustratos lipídicos y usando ATP-[γ - 32 P] como sustrato radiomarcado (Figura 17) representaron la primer evidencia de que más de una isoforma DAGK está activa en la FNF. El aumento de la actividad DAGK en presencia de SAG y OG sugiere que una de las isoformas presentes en la FNF podría ser la DAGK ϵ . Nuestros hallazgos concuerdan con los resultados reportados por Zulian y colaboradores, quienes realizaron la caracterización de las DAGK en preparaciones sinaptosomales de la corteza cerebral de rata y

observaron que en presencia de OG, las DAGK presentaron una notoria avidez para fosforilar al SAG (Zulian y col., 2006).

Estas evidencias indirectas que sugirieron la presencia de más de una isoforma DAGK en la FNF, fueron confirmadas por WB. Los ensayos de WB utilizando los anticuerpos para detectar a las isoformas de tipo I (DAGK α , β y γ), a la isoforma de tipo III (DAGK ϵ), a la isoforma de tipo IV (DAGK ζ) y a la isoforma de tipo V (DAGK θ) fueron concluyentes acerca de la presencia de todas las isoformas analizadas (Figuras 23 a, b y c).

Un hallazgo significativo fue haber demostrado una modulación selectiva de la localización nuclear de las distintas isoformas DAGK cuando las retinas fueron expuestas a la luz. Mientras que la localización nuclear de las DAGK ϵ , β y θ disminuyó en la FNF proveniente de retinas expuestas a la luz con respecto a la condición de oscuridad, la exposición de las retinas bovinas a la luz produjo un incremento en la localización nuclear de la DAGK ζ . Por su parte, la luz no indujo cambios en la localización nuclear de las DAGK α y γ .

Se ha reportado la localización nuclear de distintas isoformas de DAGK y su translocación en respuesta a diferentes estímulos extracelulares en varios tipos celulares (Wada y col., 1996). Estos autores demostraron que la DAGK α , una isoformas de tipo I de localización principalmente citosólica, transloca a la matriz nuclear de los timocitos de la rata y de los linfocitos T periféricos (Wada y col., 1996). También fue descrita la presencia de la DAGK γ en los núcleos de las células CHO-K1, así como también en las células COS-7, NIH3T3 y SH-SY5Y (Matsubara y col., 2006). Esta isoforma fue hallada en los núcleos de las células COS-7, cuando se realizaron experimentos de sobreexpresión de la enzima. Los autores observaron, además, que la fosforilación de la DAGK ζ mediada por una PKC α resulta en una redistribución de la enzima al citosol de las células COS-7 (Topham y col., 1998). La DAGK ζ fue detectada, además, en los núcleos de neuronas (Hozumi y col., 2003), del epitelio alveolar y de los macrófagos (Katagiri y col., 2005). También fue demostrado

que la noradrenalina induce una redistribución de la DAGK θ y un incremento de su actividad en las arterias de rata (Walker y col., 2001). Por su parte, fue reportada la presencia de las isoformas DAGK ζ y DAGK δ en los núcleos de las células quiescentes IIC9, y la translocación de la DAGK θ al núcleo de estas células en respuesta a la estimulación con α -Trombina (Bregoli y col., 2001).

Nuestros estudios de IHQ en la retina de rata demostraron la presencia de la DAGK ϵ en la capa nuclear externa (CNE) (constituida por los núcleos de los conos y los bastones de la retina) en la condición de oscuridad, y una disminución de su contenido en la CNE cuando los animales fueron expuestos a la luz. Estos resultados previos obtenidos en un modelo *in vivo*, en el que las condiciones de luz-oscuridad pueden ser controladas en forma precisa, refuerzan nuestro hallazgo de WB expuesto en esta tesis, en el que se observó una variación dependiente de la luz en el contenido de las DAGK ϵ en la FNF.

Teniendo en cuenta que el contenido nuclear de las isoformas analizadas fue modificado por acción de la luz, el siguiente paso fue determinar si existía un correlato entre la distribución de las enzimas y su actividad.

Se ha demostrado que la DAGK ϵ exhibe especificidad por DAG con ácido esteárico en la posición 1 (18:0) y ácido araquidónico (20:4) en la posición 2 y admite otros ácidos grasos poliinsaturados (Pettitt and Wakelam, 1999), mientras que la actividad de la DAGK ζ es menor cuando se utiliza el SAG como sustrato en comparación con la actividad que se obtienen con el DOG (Thirugnanam y col., 2001). Además, los resultados de Thirugnanam y colaboradores, demostraron que la fosfatidilserina y otros lípidos aniónicos inhiben fuertemente la actividad de la DAGK ϵ a la vez que incrementan la actividad de la DAGK ζ . En el diseño de los experimentos destinados a determinar selectivamente la actividad de las distintas isoformas DAGK, se consideraron las condiciones ideales para medir la actividad de cada isoforma, utilizando los sustratos y los detergentes apropiados para favorecer la actividad de cada una de ellas, e inhibidores de las demás isoformas presentes en el núcleo. Para

favorecer la detección de la actividad de la DAGK ϵ en la FNF se llevó a cabo un ensayo enzimático en presencia de SAG, OG como detergente, que se ha demostrado que favorece la actividad de dicha isoforma, y R59022, inhibidor de las isoformas de tipo I. Para favorecer la medida de la actividad de la DAGK ζ en los núcleos de las células fotorreceptoras, el ensayo fue realizado en presencia de DOG, Triton X-100, detergente que favorece la actividad de dicha isoforma, DOPS, inhibidor de la DAGK ϵ y estimulador de la DAGK ζ , y R59022, inhibidor de las isoformas de tipo I. Los resultados obtenidos mostraron que las enzimas detectadas en la FNF mediante estos protocolos transformaron activamente el DAG en PA (Figuras 24 y 25).

En la condición utilizada para medir la actividad de la isoforma DAGK ϵ , se observó una disminución de la formación de PA en los núcleos de las retinas expuestas a la luz respecto de la condición oscuridad, mientras que en ausencia de R59022, la formación de PA se incrementó respecto del control (Figura 25). Este resultado demostró en forma indirecta que la actividad que aumenta en la condición de luz respecto de la oscuridad sería debida a las DAGK de tipo I. Por otra parte, bajo las condiciones empleadas para medir la actividad de la DAGK ζ se observó una incrementada formación de PA en la FNF proveniente de retinas expuestas a la luz con respecto a la condición control (Figura 24). Estos resultados demostraron para la DAGK ϵ y la DAGK ζ una total correlación entre las variaciones dependientes de la luz de su contenido y su actividad. En el caso de las DAGK de tipo I, no hay correlación aparente entre la actividad medida y el contenido, es por eso que no descartamos una modulación por sustrato a partir de la activación por la luz de la PIP₂-PLC.

En este trabajo se han descrito importantes cambios dependientes de la luz en la localización nuclear de las DAGK (Figura 23). Sin embargo, cuando la actividad DAGK nuclear fue evaluada en ausencia de sustratos lipídicos exógenos, la formación de PA a partir de DAG endógeno se mostró similar en la FNF de las retinas expuestas a la luz o a la oscuridad. Nuestros hallazgos acerca de los efectos de la luz sobre la

actividad DAGK, esto es, el aumento de la actividad de la DAGK ζ y de las DAGK de tipo I, y la disminución de la actividad de la DAGK ϵ , cuyo contenido nuclear es superior al del resto, demuestran que el resultado podría ser generado por un efecto compensatorio de la actividad DAGK nuclear cuando se utilizan condiciones generales en el ensayo enzimático (Figura 21). El empleo de condiciones diferenciales para medir selectivamente la actividad de cada isoforma DAGK en la FNF, permitió confirmar los cambios inducidos por la luz sobre la actividad DAGK nuclear.

Las condiciones contrastantes que requieren las isoformas DAGK ϵ y DAGK ζ para generar su máxima actividad, así como su diferente especificidad por sustrato sugieren que estas cumplen diferentes roles en las cascadas de señalización celular (Thirugnanam y col., 2001). Los resultados presentados en esta tesis, que demuestran en la FNF un comportamiento opuesto de estas isoformas frente al estímulo lumínico sobre la retina, parecen ser indicativos de que en este modelo experimental la DAGK ϵ y la DAGK ζ cumplen distintas funciones.

Dado que las DAGK regulan el contenido de DAG y que las isoformas de PKC de tipo convencional y novel son activadas por el DAG, los cambios dependientes de la luz en el contenido y la actividad de diferentes isoformas de DAGK en la FNF podrían ser conectados con una potencial modulación de las PKC. Numerosos reportes han sugerido que las PKC cumplen importantes roles a nivel nuclear, y esto podría indicar una activación de vías de señalización que conectan las señales generadas a nivel de la membrana plasmática con el núcleo (Eyster y col., 1993; Rosenberger y col., 1995). Todas las isoformas de PKC han sido halladas en los núcleos de distintos tipos celulares bajo ciertas condiciones. Su presencia puede ser debida a su translocación desde el citoplasma, aunque también se ha reportado que pueden ser enzimas residentes a nivel nuclear. Nuestros resultados demostraron que aunque la PKC α se encuentra presente en las FNF provenientes de ambas condiciones experimentales (retinas expuestas a la luz y a la oscuridad), se produce un aumento dependiente de la luz en el contenido de pPKC α en la FNF respecto de la condición control (Figura 26).

Se ha reportado en cultivos celulares que el patrón de expresión celular y tisular de la PKC α es muy similar al de la DAGK ζ , y que estas proteínas podrían interactuar, sugiriendo que podrían residir en el mismo complejo de señalización (Luo y col., 2003). Hemos demostrado que el contenido de la DAGK ζ , al igual que en el caso de la pPKC α , se incrementa en forma dependiente de la luz. Aunque no se puede descartar totalmente que se produzca una asociación proteína-proteína en la FNF, el bajo contenido de DAGK ζ en la fracción nuclear de las células fotorreceptoras provenientes de las retinas mantenidas en oscuridad (condición control) y el contenido similar de la PKC α bajo condiciones de luz y oscuridad sugiere que estas enzimas no estarían presentes en un complejo de señalización en la FNF. Sin embargo, el aumento de la actividad de la DAGK ζ (y de su contenido) por acción de la luz en la FNF, coincidente con un aumento en el estado de activación de la PKC α , nos llevó a preguntarnos si la DAGK ζ es capaz de regular la fosforilación de la PKC α . Se ha reportado previamente que el PA actúa como inhibidor de la proteína fosfatasa 1 (PP1), y que dicha inhibición puede revertir los efectos de la ceramida mediados por PP1, como la apoptosis y la desfosforilación del producto del gen de retinoblastoma (Kishikawa y col., 1999). La activación de las DAGK nucleares parece ser un mecanismo crucial para modular los niveles de DAG y PA, y en consecuencia, la activación de ciertas proteínas cascada abajo, como las PKC. El aumento del estado de fosforilación de la PKC α en la FNF podría ser la resultante de un mecanismo que implica la inhibición de las proteínas fosfatasas, el cual podría ser regulado por la luz a través de la activación de las DAGK, productoras de PA. La disminución del contenido de pPKC α cuando la actividad DAGK nuclear fue inhibida con R59022, apoya la hipótesis de una regulación de PA sobre el estado de activación de las PKC α , por inhibición de la PP1.

Los estudios de varias isoformas de DAGK y del destino metabólico del DAG nuclear han demostrado que los sustratos *in vivo* para estas enzimas parecen ser principalmente aquellas moléculas que contienen ácidos grasos poliinsaturados en la posición sn-2, es decir, los DAG derivados de la hidrólisis de los polifosfoinosítidos

(Hodgkin y col., 1998; Jones and Hannun, 2002). Los experimentos llevados a cabo en presencia de U73122, inhibidor de la PIP₂-PLC, demostraron que la PIP₂-PLC regula la actividad DAGK en la FNF proveniente de las retinas expuestas a la luz (tanto en presencia DAG endógeno, como de sustratos exógenos). Estos resultados demostraron que la inhibición de una PIP₂-PLC activada por la exposición de las retinas a la luz genera, a nivel nuclear, una disminución de la actividad DAGK (Figura 29).

Esto significa que no solo los cambios dependientes de la luz en la localización de las distintas isoformas DAGK modulan su actividad, sino también la activación dependiente de la luz de la PIP₂-PLC. Sin embargo, nuestros resultados no nos permiten descartar que la localización dependiente de la luz de las distintas isoformas DAGK en la FNF sea debida a la activación de la PIP₂-PLC.

Nuestros resultados demostraron, además, que el contenido de la PKC α y su estado de fosforilación, dependiente de la luz, están relacionados con la activación previa de una PIP₂-PLC (Figura 31). Estos resultados son concordantes con los obtenidos cuando empleamos el inhibidor de las DAGK, el R59022, situación que indujo una disminución en el contenido de la pPKC α nuclear (Figura 27). Ambas situaciones experimentales, donde se induce la disminución en la formación del PA, conllevan a la disminución de la forma fosforilada de la PKC α . Tal como mencionamos previamente, esto nos sugiere que el PA, que es inhibidor de PP1 fosfatasa, actuaría indirectamente como regulador positivo del estado fosforilado de la PKC α .

Podemos concluir entonces que la exposición de las retinas bovinas a la luz produce la activación de una PIP₂-PLC, lo cual conduce a un incremento de la actividad DAGK nuclear y a un aumento del contenido de la PKC α total y de la pPKC α en la FNF.

La activación de la PIP₂-PLC inducida por la luz incrementa los niveles de DAG a la vez que disminuye los niveles de PIP₂. Se ha reportado una regulación selectiva del PIP₂ sobre las DAGK. La DAGK ϵ es inhibida por el PIP₂ y la fosfatidilserina, mientras que la DAGK ζ es activada por ambos fosfolípidos (Thirugnanam y col., 2001). Aunque

se observó una disminución del contenido de la DAGK ϵ en la FNF en la condición de luz, la disminución de los niveles de PIP₂ debido a una activación dependiente de la luz de la PIP₂-PLC podría incrementar la actividad de la DAGK ϵ . Por el contrario, aunque fue observado que el contenido de la DAGK ζ está incrementado en la FNF de retinas expuestas a la luz, la depleción del PIP₂ como resultado de un aumento de la actividad de la PIP₂-PLC en luz, podría operar como regulador negativo. Los experimentos realizados en presencia de neomicina, secuestrador de PIP₂, mostraron que tanto en la condición de luz como en la oscuridad se produjo un incremento de la actividad DAGK nuclear en presencia del policatión (Figura 30). Este resultado, inducido por neomicina como herramienta experimental, es indicativo de que la PIP₂-PLC activada por acción de la luz no sólo modula la actividad de las DAGK presentes en la FNF a través del aumento de DAG, sino también por la disminución del PIP₂.

Nuestros hallazgos revelaron que la luz, en paralelo a los eventos de la fototransducción desencadenados en los segmentos externos de las células fotorreceptoras de la retina bovina, produce en la FNF la activación de componentes de vías de señalización no relacionados con los conocidos participantes de dicho proceso.

Aunque no ha sido evaluado si la depleción nuclear de la DAGK ϵ dependiente de la luz es un proceso relacionado con su eventual migración hacia el segmento externo, es una hallazgo que refuerza la observación previa de nuestro grupo de trabajo (Natalini y col., 2013).

La exposición de las retinas bovinas a la luz no solo produjo una depleción parcial de las DAGK ϵ , β y θ nucleares, sino que también promovió la activación de la DAGK ϵ nuclear remanente, posiblemente para asegurar la generación de un PA derivado de SAG, necesario para la resíntesis de los polifosfoinosítidos. Estos datos son consistentes con los propuestos por otros autores que aseguran que el objetivo final de la transformación de DAG en PA por las DAGK a nivel nuclear es la resíntesis de

PI. Estos datos son claramente sustentados por el hecho de que todas las enzimas implicadas en el ciclo del PI han sido halladas en el núcleo de las células (Baker and Chang, 1990; Payrastre y col., 1992). En paralelo, un incremento en el contenido de la DAGK ζ (isoforma con condiciones de modulación contrastantes con respecto a la DAGK ϵ) revela que la transformación del DAG nuclear es finamente regulada bajo condiciones específicas dependientes de la luz.

Por otra parte, hemos demostrado que la pPKC α nuclear, que está involucrada en una gran variedad de funciones nucleares, tales como el control de la replicación del ADN, la síntesis del ARN mensajero, el procesamiento, el transporte núcleo-citoplasma y estructura de la cromatina (Martelli y col., 2003), es modulada por estas DAGK diferencialmente reguladas por la luz.

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DEL CAPÍTULO II

Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que la insulina, de conocida acción neuroprotectora, regula vías de transducción de señales que involucran moléculas lipídicas tales como el PA y el DAG en el SNC (Salvador y col., 2005). Resultados recientes de nuestro grupo de investigación reportaron que en los sinaptosomas de la corteza cerebral de rata, la insulina ejerce un efecto estimulador sobre la actividad de la/s DAGK a través de dos mecanismos: a) un aumento de los niveles de DAG a través de la activación de las vías PI-PLC y PLD/PAP2, que generan diacilglicéridos de composición insaturada y saturada, respectivamente y b) un estímulo de la DAGK, independiente de la generación de DAG. Esta activación responde a una isoforma en particular, la DAGK ϵ , que preferentemente utiliza al SAG como sustrato (Zulian y col., 2009). A partir de los resultados obtenidos en los sinaptosomas de la CC y el hipocampo de animales seniles, donde también se evaluó la acción de insulina sobre la fosforilación de los fosfoinosítidos, fue postulado que esta acción de la insulina sobre la DAGK ϵ podría explicar parcialmente su efecto neuroprotector teniendo en cuenta que la actividad de esta isoforma podría estar relacionada a la resíntesis de los fosfoinosítidos (Zulian y col., 2011).

La retina es una parte integral del SNC y sus células expresan al receptor de insulina (Havrankova y col., 1978). En estudios *in vivo* (en modelos de rata y ratón) se ha demostrado que la luz es capaz de activar a la vía de la PI3K en los segmentos externos de la retina a través de la activación del RI (mediante la fosforilación de los residuos de tirosina del RI). Estos resultados sugirieron que existe un *cross-talk* entre la fototransducción y otras vías de transducción de señales (Rajala y col., 2002). Este grupo de investigación, además, reportó que la fosforilación del RI por la luz es mediada por el fotoblanqueo de la rodopsina, pero que es independiente de la activación de la transducina, sugiriendo que la fosforilación del RI en los bastones de la retina es señalizada a través de la rodopsina acoplada a la proteína G. Más

adelante, demostraron que las vías de señalización activadas por el RI son fundamentales para la supervivencia de los bastones y de los conos de la retina (Ivanovic y col., 2011).

El hallazgo discutido en el Capítulo precedente sobre el incremento del contenido de la pPKC α nuclear y su regulación por las DAGK, abrió un interrogante respecto a la existencia de mecanismos de fosforilación y defosforilación de la PKC a nivel nuclear en la FNF.

Una de las proteínas que se ha demostrado que participa en la fosforilación de la PKC es la quinasa dependiente de los fosfoinosítidos, PDK1. Esta es una serina-treonina quinasa activada por el PIP₃, fosfoinosítido producido por la PI3K, la cual es activada en respuesta a la señalización generada por algunos factores de crecimiento y hormonas, tales como la insulina o el IGF-1. Se ha reportado que la PDK, que está constitutivamente “excluida” del núcleo de los mamíferos, puede translocar al núcleo de las células por fosforilación de una secuencia de exclusión nuclear (NES) que en condiciones normales impide su localización nuclear (Scheid y col., 2005). Estos autores demostraron, además, que en células en cultivo, el IGF-1 promueve la translocación de la PDK1 al núcleo por activación de la PI3K.

El objetivo del capítulo II fue determinar si los efectos desencadenados por la luz en la FNF, tales como el aumento de la pPKC α y la localización diferencial de distintas isoformas de DAGK, están relacionados con una eventual activación por luz del receptor de insulina y de vías de señalización relacionadas. También fueron evaluados los efectos de la insulina sobre distintas vías de señalización en la FNF.

En primer lugar, fue determinada la presencia de los principales componentes de las vías de señalización activadas por la insulina, tales como la vía de la PI3K/Akt y la vía de las MAPK, en los núcleos de las células fotorreceptoras. También fue demostrado que la luz es moduladora del estado de activación de los mismos a nivel nuclear. Nuestros resultados demostraron que en la FNF están presentes ERK1/2 y fosfo-p38 (componentes de la vía de señalización de las MAPK) y Akt (componente principal de

la vía de señalización de la PI3K). Se demostró, además, que el estímulo lumínico sobre las retinas bovinas induce la activación de Akt a nivel nuclear (Figura 33), mientras que parece inducir la translocación de la forma activada de ERK1/2 (pERK1/2) hacia el núcleo (Figura 32).

Una importante faceta de la compleja regulación de ERK1/2 es su compartimentalización subcelular. ERK en su estado activo, fosforila a más de 150 sustratos proteicos, con aproximadamente el mismo número de sustratos en el citosol y en el núcleo (Yoon and Seger, 2006). Por lo tanto, el transporte núcleo-citoplasma es un determinante importante de la función de ERK. En las células en reposo, ERK está localizada predominantemente en el citoplasma; una vez fosforilada por MEK, ERK se libera de las proteínas de andamiaje citoplasmáticos y transloca rápidamente al núcleo (Burack and Shaw, 2005; Costa y col., 2006; Horgan and Stork, 2003; Lidke y col., 2010; Marchi y col., 2010; Zehorai y col., 2010). En los fibroblastos se reportó que ERK1/2 transloca de forma rápida y persistente al núcleo en respuesta a mitógenos fuertes, mientras que su activador común p45 permanece en el citoplasma (Lidke y col., 2010). Este resultado es concordante con nuestros hallazgos que demostraron que se produce una translocación de la forma activada de ERK1/2 en respuesta al estímulo lumínico.

Por el contrario, nuestros resultados difieren con los obtenidos por Glotin et al, quienes demostraron en las células en cultivo del epitelio pigmentario de la retina (células ARPE) que en respuesta al estrés oxidativo por el tratamiento con ter-butyl hidroperóxido (t-BHP), la forma activa de ERK1/2 estuvo presente en el núcleo de las células solo durante los 10 min posteriores a la estimulación con suero, mientras que la ERK1/2 total fue detectada en el núcleo de las células durante las 6 horas posteriores al tratamiento con t-BHP. Estos resultados demostraron que la forma inactiva (no fosforilada) se acumula en el núcleo de las células apoptóticas debido al estrés oxidativo (Glotin y col., 2006).

Ambos tipos de resultados con ERK1/2 se desencadenan en respuesta a dos agresiones diferentes. Nuestros resultados, sin embargo, estarían revelando la participación de ERK1/2 en una respuesta fisiológica de la retina frente al estímulo lumínico, en donde, si bien no desconocemos que en la exposición de la media copa del ojo (que contiene la retina) no hay presentes barreras naturales de protección, también hemos probado que no hay evidencias de daño relacionadas con la fragmentación del ADN y el incremento de *TBARS* (Figura 19).

La localización celular de la proteína p38-MAPK es un tema controvertido ya que no es claro lo que ocurre en las células quiescentes luego de ser estimuladas. Existen evidencias de que p38-MAPK se transloca al núcleo tras su activación (Raingeaud y col., 1995), aunque hay otra serie de evidencias que demuestran que en similares circunstancias se encuentra tanto en el núcleo como en el citoplasma (Ben-Levy y col., 1998). Nuestros resultados mostraron que la forma fosforilada de p38 (fosfo-p38) se localiza en los núcleos de las células fotorreceptoras de la retina bovina, y que su contenido aumenta en respuesta a la luz.

Se ha reportado que los bastones retinianos expresan las tres isoformas de Akt (Li y col., 2007). Estos autores comprobaron además que no hay redundancia funcional entre ellas, dado que cada isoforma es activada bajo ciertas condiciones (Li y col., 2007). Demostraron que la luz fisiológica es capaz de activar al RI generando la activación de la PI3K y de Akt tipo 2 (Rajala y col., 2002), mientras que la insulina sólo produce un aumento de la actividad quinasa de la isoforma Akt 1 en la retina (Reiter y col., 2003). En este trabajo de tesis, hemos determinado la presencia de Akt en los núcleos de las células fotorreceptoras y hemos demostrado que la luz produce un incremento de su estado de fosforilación utilizando anticuerpos que reconocen a las tres isoformas de Akt. Teniendo en cuenta que se ha demostrado que la luz produce la activación de Akt 2 en los bastones de retina, y que la misma es capaz de translocar al núcleo una vez fosforilada, podríamos considerar que la isoforma detectada en nuestro modelo es Akt 2.

Los trabajos de Rajala también demostraron que en condiciones de estrés lumínico se produce la activación del receptor de IGF-1, iniciando una cascada similar (Rajala y col., 2008). Estos autores propusieron que la activación de estas vías de señalización constituye un mecanismo de protección. Como mencionamos previamente, hemos demostrado que el protocolo de exposición a la luz utilizado en esta tesis doctoral induce niveles prácticamente indetectables de *TBARS* en los homogenados de las retinas expuestas a la luz y a la oscuridad (Figura 19 b). Además, las observaciones de los diferentes planos focales de las FNF obtenidas a partir de las retinas expuestas a la luz o a la oscuridad mediante microscopía confocal de fluorescencia nos permitieron descartar la existencia de ADN fragmentado (Figura 19 a). Aunque ambas determinaciones indicadoras de daño fueron negativas, no es posible asegurar que el protocolo de luz realizado no induzca respuestas tempranas relacionadas al estrés por luz.

Los resultados descritos nos motivaron a realizar los experimentos para determinar si la incubación de las retinas bovinas con insulina y la posterior exposición a la luz-oscuridad, o la incubación directa de los núcleos aislados de la FNF con insulina-vanadato, previa exposición de las retinas a la luz, induce algún cambio en la actividad de las DAGK nucleares.

Los resultados demostraron que la insulina regula la actividad DAGK nuclear, y que ejerce sus efectos actuando tanto a nivel de la retina entera (acción mediada ó indirecta) como también directamente sobre los núcleos de la FNF (Figura 34). Cuando se realizó la incubación de las retinas bovinas en un medio con insulina-vanadato (exposición de la copa del ojo), se produjo una disminución de la actividad DAGK nuclear en las retinas expuestas a la luz, sin cambios en la FNF proveniente de retinas mantenidas en oscuridad. Estos resultados sugieren que la luz interviene en este mecanismo llevado a cabo por la insulina. Sorpresivamente, la incubación de los núcleos aislados con insulina produjo un estímulo significativo de la actividad DAGK

nuclear, diferentes a los efectos indirectos obtenidos por la exposición de la retina entera en la copa del ojo.

Estos resultados sugirieron la posible presencia del receptor de insulina en los núcleos de las células fotorreceptoras de la retina bovina. En principio, se demostró que los efectos directos de la insulina sobre la DAGK de la FNF son dependientes de la concentración de insulina empleada en el ensayo. Una concentración de insulina 0,2 μM produjo un aumento de la actividad DAGK tanto en la condición de luz como en la oscuridad, mientras que cuando fue empleada una concentración de insulina 0,8 μM , la formación de PA a partir de DAG fue dependiente de la luz (no se observaron cambios significativos en la condición del control, oscuridad) y fue significativamente mayor que cuando se empleó una concentración de insulina 0,2 μM (Figura 34).

Nuestros resultados sobre la activación de las DAGK, derivados de los efectos directos de la insulina sobre la FNF, se condicen con los descritos por Zulian y col., quienes demostraron que la incubación de los sinaptosomas de la corteza cerebral y el hipocampo de rata con insulina induce un incremento en la actividad DAGK (Zulian y col., 2006; Zulian y col., 2011). Sin embargo, nuestro hallazgo resulta sorprendente dado que la localización nuclear del RI ha sido reportada en muy pocos sistemas biológicos. La pregunta obvia que surgió de nuestros hallazgos precedentes fue si los efectos directos de la insulina a nivel nuclear se deben a la presencia del RI en los núcleos de las células fotorreceptoras. Para responder a esta cuestión, se realizaron ensayos de WB con el fin de determinar si el RI está presente en la FNF, y comparativamente se analizó su presencia en la FNR. Nuestros resultados demostraron la presencia del RI en ambas fracciones nucleares, siendo mayor su contenido en la FNR (Figura 42). De estos resultados se dedujo que el RI no solo está presente en los núcleos de las células fotorreceptoras, sino también en los núcleos de otros tipos celulares de la retina.

Se realizaron, además, ensayos para determinar si la luz es capaz de modular el contenido del RI nuclear en la FNF. Los resultados de WB e IF indicaron que el RI está

presente en la FNF de las retinas expuestas a la luz y a la oscuridad. Además se pudo observar que los núcleos provenientes de las retinas expuestas a la luz presentan un mayor contenido de RI que aquellos provenientes de las retinas control (mantenidas en oscuridad), lo cual podría indicar que la luz promueve una translocación del RI desde la membrana plasmática hacia el núcleo (Figuras 43 y 44).

La localización nuclear de los receptores de factores de crecimiento ha sido reportada anteriormente (Carpenter, 2003). Entre ellos, se incluyen el receptor del factor de crecimiento epidérmico, el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos y el receptor de insulina. En los dos primeros casos fue demostrado que la translocación del receptor al núcleo ocurre de forma ligando-dependiente y ligando-independiente (Johnston y col., 1995; Lin y col., 2001; Seol and Kim, 2003). En cuanto a la translocación del RI, en los hepatocitos fue determinado que como resultado de la unión de la insulina al receptor de la membrana celular, el complejo insulina-receptor es capaz de translocar al núcleo de la célula por un proceso dependiente del tiempo y de la temperatura (Podlecki y col., 1987). Estudios más recientes corroboraron que el RI efectivamente transloca y actúa dentro del núcleo de los hepatocitos (Rodriguez y col., 2008). Los estudios previos y los más recientes sugirieron que la insulina induce la translocación de su receptor hacia el núcleo de los hepatocitos. Hasta el momento no se ha determinado en ningún tipo celular la translocación del RI de una manera ligando-independiente. Nuestros hallazgos demostraron la presencia del RI en los núcleos de las células fotorreceptoras en ausencia de su ligando, y sugieren que el RI podría translocar al núcleo en respuesta a la luz, o bien, que este receptor podría ser constitutivo del núcleo en este tipo celular.

Dado que la translocación del receptor de insulina al núcleo en respuesta a la insulina fue demostrada en otros tipos celulares, realizamos los ensayos destinados a evaluar si la insulina es capaz de promover un mayor contenido del receptor de insulina en la FNF y/o de potenciar los efectos generados por la luz. Nuestros resultados evidenciaron que la insulina produce un aumento del contenido del RI en la FNF, y que

contribuye al aumento del mismo generado por la luz (Figura 45). Estos datos sugieren que ambos estímulos promueven la translocación del RI a los núcleos de las células fotorreceptoras de la retina bovina.

La presencia del receptor de insulina en la FNF, cuyo contenido aumenta por la exposición de las retinas bovinas a la luz y por la incubación de las retinas con insulina, resulta concordante con los hallazgos que demostraron que la luz produce un aumento del contenido de Akt activada a nivel nuclear, y con la translocación hacia el núcleo de ERK1/2 activada. Estos resultados nos permiten sugerir la existencia de una vía de señalización desencadenada por la activación del receptor de insulina en respuesta a la luz, asociada con la activación de componentes de señalización que, a nivel nuclear, podrían estar implicados en la regulación de factores de transcripción implicados en la neuroprotección de las células fotorreceptoras de la retina bovina. Por otra parte, el aumento de la actividad DAGK nuclear debido a la incubación de los núcleos aislados con insulina, así como también la presencia de ERK1/2 activada en la FNF, sugieren que estos efectos también serían mediados por el receptor de insulina nuclear.

*RESUMEN DE RESULTADOS Y
CONCLUSIONES*

RESUMEN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos, descriptos en los dos capítulos de esta Tesis y enumerados en forma resumida, son los siguientes:

- Se obtuvo una fracción nuclear purificada, que está altamente enriquecida en los núcleos de las células fotorreceptoras (FNF) con respecto a la fracción nuclear total de la retina bovina (FNR).
- Fue demostrada la actividad DAGK en la FNF y se determinó linealidad en función del tiempo y de la concentración de proteínas (hasta 30 min y hasta 250 μg de proteínas) así como los valores de K_m y $V_{\text{máx}}$ aparentes para el ATP y el DOG.
- El empleo de detergentes iónicos (DCNa) o no iónicos (OG ó Tritón X-100) en el ensayo enzimático influyó significativa y diferencialmente sobre la actividad DAGK nuclear, sugiriendo la presencia de varias isoformas de DAGK en la FNF.
- Mediante WB se demostró la presencia de todas las isoformas de DAGK analizadas ($\alpha, \beta, \gamma, \epsilon, \zeta, \theta$) en la FNF.
- Utilizando un protocolo de exposición a la luz (280 cd o 3000 luxes, durante 30 min), que no indujo fragmentación del ADN ni produjo niveles significativos de TBARS en el homogenado de la retina, se determinó que:
- La luz produjo un aumento significativo de la actividad DAGK en la FNF, mientras que no indujo cambios significativos en la FNR, cuando el ensayo enzimático fue realizado en ausencia de DAG exógenos y de detergentes. Sin embargo, el estímulo lumínico indujo una disminución significativa de la formación de PA cuando los sustratos exógenos DOG y SAG estuvieron presentes en el ensayo enzimático. Estos resultados sugirieron que la luz ejerce efectos diferentes sobre cada isoforma de DAGK.

- Mediante WB se demostró que la luz produjo cambios en el contenido de las isoformas de DAGK analizadas a nivel nuclear (un aumento en el caso de la DAGK ζ , una disminución en el contenido de las DAGK β , ϵ y θ , y no produjo modificaciones en el contenido de las DAGK α y γ).
- Los ensayos de actividad enzimática empleando condiciones selectivas para preferenciar la actividad de las isoformas de DAGK ζ y ϵ demostraron que existe una fuerte correlación entre los efectos que produce la luz sobre el contenido y sobre la actividad de las isoformas analizadas.
- La luz produjo, además, un aumento del estado de fosforilación de la PKC α nuclear, sin inducir cambios en el contenido de la PKC α total, mientras que cuando las DAGK fueron inhibidas por el empleo de R59022, el contenido de la pPKC α en la FNF proveniente de las retinas expuestas a la luz disminuyó significativamente, lo cual implica un rol de las DAGK sobre el estado de fosforilación de la PKC α .
- Los ensayos enzimáticos para determinar la actividad DAGK en presencia de un inhibidor y un activador de PKC (BIM y PMA, respectivamente) demostraron que las PKC no regulan la actividad DAGK en la FNF bajo nuestras condiciones de ensayo.
- Los estudios con inhibidores de PIP₂-PLC, que selectivamente disminuyen al producto DAG ó que “secuestran” al sustrato PIP₂, (U73122 y Neomicina, respectivamente) demostraron que el aumento de la actividad DAGK nuclear en respuesta a la luz es dependiente de la activación previa de una PIP₂-PLC, y que el DAG no es el único mensajero derivado de PLC involucrado en esta regulación de la actividad DAGK, sino que también participa en dicha regulación el PIP₂. Además, determinamos que la PIP₂-PLC también está involucrada en el aumento del estado de fosforilación de PKC α .
- Mediante WB se demostró que la luz también produjo cambios en el contenido de PKB/Akt, ERK1/2 y p38 en la FNF. Mientras que en el caso de Akt y p38 se

produjo un incremento de su estado fosforilado a nivel nuclear, la luz promovió la translocación de ERK1/2 en su forma fosforilada al núcleo, sugiriendo la participación del receptor de insulina, activable por la luz, en la regulación del contenido de estos mediadores a nivel nuclear.

- Se demostró que la insulina ejerce efectos significativos sobre la actividad DAGK nuclear, de tipo indirecto o mediado (a través de la exposición de las retinas a la insulina) y efectos directos (por exposición de la FNF), sugiriendo la presencia de receptor de insulina a nivel nuclear.
- Mediante WB e IF se demostró la presencia de RI en la FNF y se determinó que la exposición de las retinas a la luz produjo un incremento en el contenido del mismo a nivel nuclear.
- La exposición directa de la FNF a la insulina indujo un incremento de la actividad DAGK y de la fosforilación de los fosfoinosítidos (PPI). El efecto de los inhibidores U73122 y LY, indica la mediación de PIP₂-PLC y de PI3K en los efectos sobre PA y PPI, respectivamente.
- Mediante WB se demostró que en la condición de luz, la exposición de las retinas a la insulina produce un aumento del contenido del RI en la FNF respecto al valor hallado en la condición control, en presencia de vanadato únicamente.
- Mientras que la exposición de los núcleos aislados a la insulina no modificó el contenido del RI nuclear, se produjo un aumento significativo en el contenido de pERK1/2 en la FNF.

Podemos concluir entonces que:

En este trabajo de tesis se demostró la presencia y la actividad de distintas isoformas de DAGK en una fracción altamente enriquecida en los núcleos de las células fotorreceptoras de la retina bovina. Asimismo, fue determinado que el estímulo natural de la retina, la luz, es capaz de regular tanto la actividad como la localización nuclear de las distintas isoformas de DAGK analizadas, específicamente con un incremento de

la DAGK ζ y una disminución en el contenido de DAGK ϵ , DAGK β y DAGK θ , sin modificaciones en el contenido de la DAGK α y la DAGK γ .

Se pudo demostrar que la vía activada en respuesta a la luz y moduladora de la actividad DAGK involucra a una PIP₂-PLC. Además, se demostró que la luz produce un aumento del estado de fosforilación de la PKC α nuclear, el cual es a su vez modulado por la actividad DAGK e involucra la activación previa de una PIP₂-PLC.

Los resultados obtenidos en la segunda etapa de esta tesis demostraron que la luz induce la activación de vías de señalización relacionadas con la insulina, y que es capaz de promover la translocación del receptor de insulina al núcleo de las células fotorreceptoras de la retina bovina. Por su parte, la insulina, ligando natural del RI, es capaz de modular la actividad DAGK nuclear ejerciendo efectos tanto sobre la retina bovina (efectos indirectos), actuando sobre el RI de la membrana plasmática, como sobre los núcleos aislados (efectos directos) actuando sobre el RI nuclear. Esta, además, es capaz de potenciar los efectos de la luz respecto a la translocación del RI al núcleo de las células fotorreceptoras, y de promover la activación de componentes de la vía de las MAPK actuando sobre el RI nuclear.

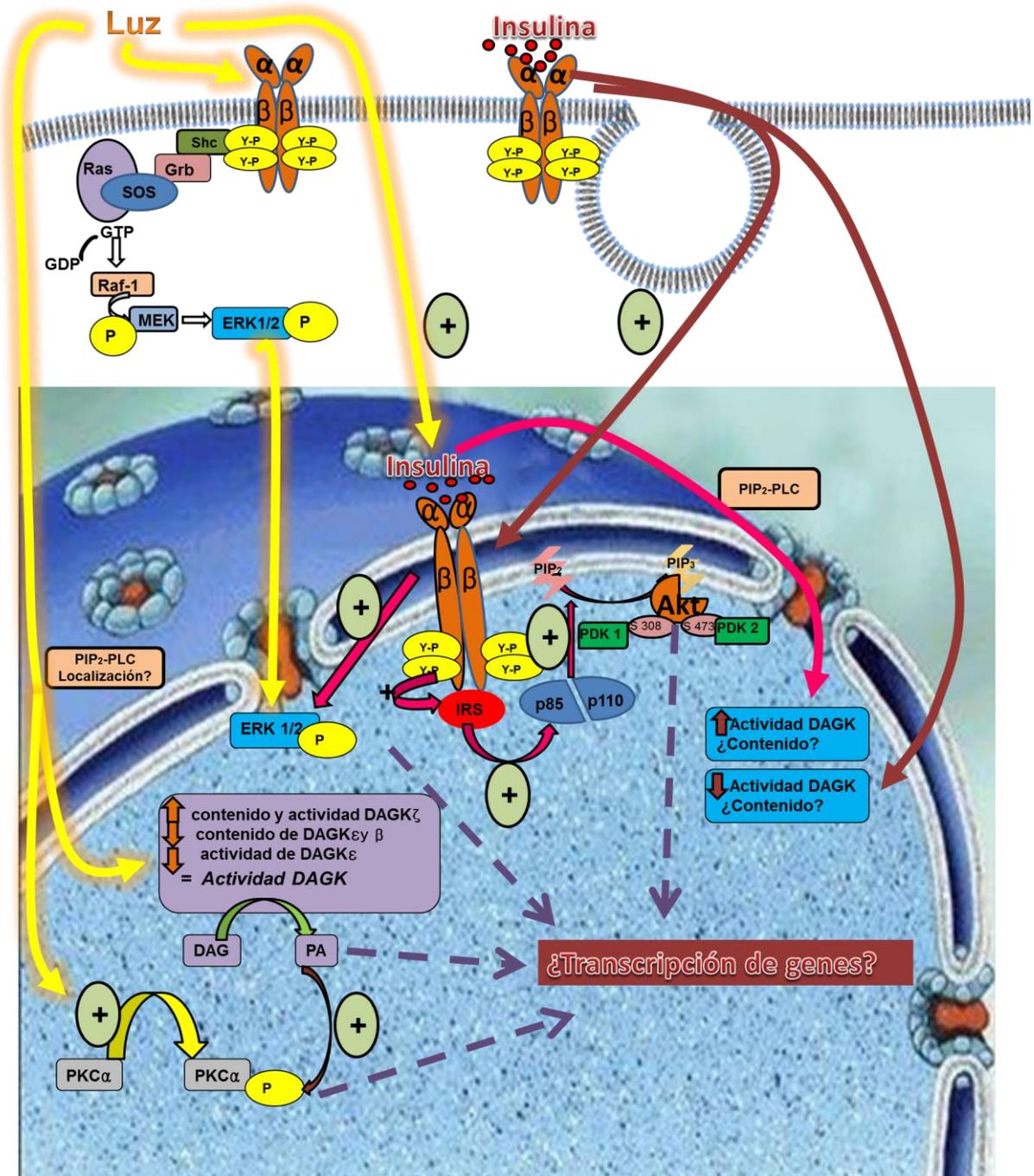
Entendemos que la acción de la luz y de la insulina, ambos desencadenantes de un aumento del contenido de RI nuclear, así como de la modulación de mediadores de dos vías de señalización de insulina, como la vía de la PI3K/Akt y la vía de las MAPK, y los efectos sobre la vía de señalización ligada a la PIP₂-PLC que regula a las DAGK y al estado de fosforilación de la PKC α , revelan la existencia de vías de señalización reportadas por primera vez en el núcleo de las células fotorreceptoras de la retina bovina. Consideramos que la función de todos estos componentes, activados en respuesta a un estímulo lumínico fisiológico (que no induce daño foto-oxidativo), puede ser relacionada con la regulación de factores de transcripción implicados en procesos necesarios para el normal funcionamiento de la célula fotorreceptora.

Por otra parte, la translocación del receptor de insulina, promovida tanto por la luz como por la insulina, hacia los núcleos de las células fotorreceptoras, sugiere nuevos roles del mismo en las células fotorreceptoras de la retina.

La desregulación de cualquiera de las vías de señalización reguladas por la luz a nivel nuclear, podría ser un factor desencadenante de alguna patología de la retina.

Estos hallazgos nos alientan a emprender futuros estudios para comprender el mecanismo molecular y el significado fisiológico de los mismos.

Por el momento, presentamos a continuación una descripción gráfica de los mismos (esquema 1), junto a los eventuales componentes moleculares que podrían integrar, a nivel nuclear, estas vías de señalización presentes en la retina, asociadas a la acción de la luz y a la activación del receptor de insulina.



Esquema representativo de las vías de señalización activadas a nivel nuclear en respuesta a la luz y a la insulina: Las flechas amarillas indican los componentes moleculares activados en respuesta a la luz. Las flechas moradas indican los efectos a nivel nuclear generados por la acción de la insulina sobre su receptor de membrana plasmática. Las flechas fucsia indican los componentes activados por la activación del receptor de insulina nuclear. Las líneas discontinuas representan el posible efecto derivado de la activación de los componentes celulares analizados en la FNF.

Referencias

- AMES, A., III and HASTINGS, A.B., 1956. Studies on water and electrolytes in nervous tissue. I. Rabbit retina: methods and interpretation of data. *J.Neurophysiol.* 19, 201-12.
- Arvidson, G.A., 1968. Structural and metabolic heterogeneity of rat liver glycerophosphatides. *Eur.J.Biochem.* 4, 478-86.
- Aveldaño, M.I., Bazán, N.G., 1974. Free fatty acids, diacyl- and triacylglycerols and total phospholipids in vertebrate retina: comparison with brain, choroid and plasma. *J Neurochem.* 23, 1127-35.
- Baker, R.R. and Chang, H., 1990. Phosphatidylinositol synthetase activities in neuronal nuclei and microsomal fractions isolated from immature rabbit cerebral cortex. *Biochim.Biophys.Acta* 1042, 55-61.
- Barber, A.J., Nakamura, M., Wolpert, E.B., Reiter, C.E., Seigel, G.M., Antonetti, D.A. and Gardner, T.W., 2001. Insulin rescues retinal neurons from apoptosis by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-mediated mechanism that reduces the activation of caspase-3. *J.Biol.Chem.* 276, 32814-21.
- Bavelloni, A., Faenza, I., Cioffi, G., Piazzzi, M., Parisi, D., Matic, I., Maraldi, N.M. and Cocco, L., 2006. Proteomic-based analysis of nuclear signaling: PLCbeta1 affects the expression of the splicing factor SRp20 in Friend erythroleukemia cells. *Proteomics.* 6, 5725-34.
- Ben-Levy, R., Hooper, S., Wilson, R., Paterson, H.F. and Marshall, C.J., 1998. Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2. *Curr.Biol.* 8, 1049-57.
- Bertagnolo, V., Marchisio, M., Capitani, S. and Neri, L.M., 1997. Intranuclear translocation of phospholipase C beta2 during HL-60 myeloid differentiation. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 235, 831-7.
- Bertagnolo, V., Marchisio, M., Volinia, S., Caramelli, E. and Capitani, S., 1998. Nuclear association of tyrosine-phosphorylated Vav to phospholipase C-gamma1 and phosphoinositide 3-kinase during granulocytic differentiation of HL-60 cells. *FEBS Lett.* 441, 480-4.
- Black, J.D., 2000. Protein kinase C-mediated regulation of the cell cycle. *Front Biosci.* 5, D406-D423.
- Blobel, G. and Potter, V.R., 1966. Nuclei from rat liver: isolation method that combines purity with high yield. *Science* 154, 1662-5.
- Bokoch, G.M., Reilly, A.M., Daniels, R.H., King, C.C., Olivera, A., Spiegel, S. and Knaus, U.G., 1998. A GTPase-independent mechanism of p21-activated kinase activation. Regulation by sphingosine and other biologically active lipids. *J.Biol.Chem.* 273, 8137-44.
- Bregoli, L., Baldassare, J.J. and Raben, D.M., 2001. Nuclear diacylglycerol kinase-theta is activated in response to alpha-thrombin. *J.Biol.Chem.* 276, 23288-95.

- Buchner, K., 1995. Protein kinase C in the transduction of signals toward and within the cell nucleus. *Eur.J.Biochem.* 228, 211-21.
- Bunting, M., Tang, W., Zimmerman, G.A., McIntyre, T.M. and Prescott, S.M., 1996. Molecular cloning and characterization of a novel human diacylglycerol kinase zeta. *J.Biol.Chem.* 271, 10230-6.
- Burack, W.R. and Shaw, A.S., 2005. Live Cell Imaging of ERK and MEK: simple binding equilibrium explains the regulated nucleocytoplasmic distribution of ERK. *J.Biol.Chem.* 280, 3832-7.
- Burns, M.E. and Arshavsky, V.Y., 2005. Beyond counting photons: trials and trends in vertebrate visual transduction. *Neuron* 48, 387-401.
- Caricasole, A., Bettini, E., Sala, C., Roncarati, R., Kobayashi, N., Caldara, F., Goto, K. and Terstappen, G.C., 2002. Molecular cloning and characterization of the human diacylglycerol kinase beta (DGKbeta) gene: alternative splicing generates DGKbeta isoforms with different properties. *J.Biol.Chem.* 277, 4790-6.
- Carpenter, G., 2003. Nuclear localization and possible functions of receptor tyrosine kinases. *Curr.Opin.Cell Biol.* 15, 143-8.
- Castagnet, P.I. and Giusto, N.M., 1993. Properties of phospholipase A2 activity from bovine retinal rod outer segments. *Exp.Eye Res.* 56, 709-19.
- Castagnet, P.I., Roque, M.E., Pasquare, S.J. and Giusto, N.M., 1998. Phosphorylation of rod outer segment proteins modulates phosphatidylethanolamine N-methyltransferase and phospholipase A2 activities in photoreceptor membranes. *Comp Biochem.Physiol B Biochem.Mol.Biol.* 120, 683-91.
- Chiu, S-L., Cline H.T., 2010. Insulin receptor signaling in the development of neuronal structure and function. *Neural Dev.* 15;5-7.
- Cocco, L., Maraldi, N.M., Capitani, S., Martelli, A.M. and Manzoli, F.A., 2001. Nuclear localization and signalling activity of inositol lipids. *Ital.J.Anat.Embryol.* 106, 31-43.
- Cocco, L., Maraldi, N.M., Manzoli, F.A., Gilmour, R.S. and Lang, A., 1980. Phospholipid interactions in rat liver nuclear matrix. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 96, 890-8.
- Cockcroft, S., 1992. G-protein-regulated phospholipases C, D and A2-mediated signalling in neutrophils. *Biochim.Biophys.Acta* 1113, 135-60.
- Cockcroft, S. and Thomas, G.M., 1992. Inositol-lipid-specific phospholipase C isoenzymes and their differential regulation by receptors. *Biochem.J.* 288 (Pt 1), 1-14.
- Cooney, M.A., Malcuit, C., Cheon, B., Holland, M.K., Fissore, R.A. and D'Cruz, N.T., 2010. Species-specific differences in the activity and nuclear localization of murine and bovine phospholipase C zeta 1. *Biol.Reprod.* 83, 92-101.
- Costa, M., Marchi, M., Cardarelli, F., Roy, A., Beltram, F., Maffei, L. and Ratto, G.M., 2006. Dynamic regulation of ERK2 nuclear translocation and mobility in living cells. *J.Cell Sci.* 119, 4952-63.

- D'Santos, C., Clarke, J.H., Roefs, M., Halstead, J.R. and Divecha, N., 2000. Nuclear inositides. *Eur.J.Histochem.* 44, 51-60.
- D'Santos, C.S., Clarke, J.H. and Divecha, N., 1998. Phospholipid signalling in the nucleus. Een DAG uit het leven van de inositide signalering in de nucleus. *Biochim.Biophys.Acta* 1436, 201-32.
- Delon, C., Manifava, M., Wood, E., Thompson, D., Krugmann, S., Pyne, S. and Ktistakis, N.T., 2004. Sphingosine kinase 1 is an intracellular effector of phosphatidic acid. *J.Biol.Chem.* 279, 44763-74.
- Dempsey, E.C., Newton, A.C., Mochly-Rosen, D., Fields, A.P., Reyland, M.E., Insel, P.A. and Messing, R.O., 2000. Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 279, L429-L438.
- Diaz, B., Serna, J., De, P.F. and de la Rosa, E.J., 2000. In vivo regulation of cell death by embryonic (pro)insulin and the insulin receptor during early retinal neurogenesis. *Development* 127, 1641-9.
- Dillon, D.A., Chen, X., Zeimet, G.M., Wu, W.I., Waggoner, D.W., Dewald, J., Brindley, D.N. and Carman, G.M., 1997. Mammalian Mg²⁺-independent phosphatidate phosphatase (PAP2) displays diacylglycerol pyrophosphate phosphatase activity. *J.Biol.Chem.* 272, 10361-6.
- Ding, L., Traer, E., McIntyre, T.M., Zimmerman, G.A. and Prescott, S.M., 1998. The cloning and characterization of a novel human diacylglycerol kinase, DGK α . *J.Biol.Chem.* 273, 32746-52.
- Divecha, N., Banfic, H. and Irvine, R.F., 1991. The polyphosphoinositide cycle exists in the nuclei of Swiss 3T3 cells under the control of a receptor (for IGF-I) in the plasma membrane, and stimulation of the cycle increases nuclear diacylglycerol and apparently induces translocation of protein kinase C to the nucleus. *EMBO J.* 10, 3207-14.
- Divecha, N., Clarke, J.H., Roefs, M., Halstead, J.R. and D'Santos, C., 2000. Nuclear inositides: inconsistent consistencies. *Cell Mol.Life Sci.* 57, 379-93.
- Divecha, N., Rhee, S.G., Letcher, A.J. and Irvine, R.F., 1993. Phosphoinositide signalling enzymes in rat liver nuclei: phosphoinositidase C isoform beta 1 is specifically, but not predominantly, located in the nucleus. *Biochem.J.* 289 (Pt 3), 617-20.
- Doucet, C.M. and Hetzer, M.W., 2010. Nuclear pore biogenesis into an intact nuclear envelope. *Chromosoma* 119, 469-77.
- Ehrenhofer-Murray A, 2004. Chromatin dynamics at DNA replication, transcription and repair. *Eur J Biochem.* 12, 2335-49.
- Epand, R.M., Shulga, Y.V., Timmons, H.C., Perri, A.L., Belani, J.D., Perinpanathan, K., Johnson-McIntire, L.B., Bajjalieh, S., Dicu, A.O., Elias, C., Rychnovsky, S.D. and Topham, M.K., 2007. Substrate chirality and specificity of diacylglycerol kinases and the multisubstrate lipid kinase. *Biochemistry* 46, 14225-31.
- Erol, A., 2008. An integrated and unifying hypothesis for the metabolic basis of sporadic Alzheimer's disease. *J.Alzheimers.Dis.* 13, 241-53.

- Evangelisti, C., Bortul, R., Tabellini, G., Papa, V., Cocco, L. and Martelli, A.M., 2006. Nuclear expression of diacylglycerol kinases: possible involvement in DNA replication. *Eur.J.Histochem.* 50, 9-13.
- Exton, J.H., 1994. Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction. *Biochim.Biophys.Acta* 1212, 26-42.
- Eyster, K.M., Teixeira, F., Zakar, T. and Olson, D.M., 1993. Protein kinase-C stimulatory activity in human amnion cytosol. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 76, 424-8.
- Faenza, I., Bavelloni, A., Fiume, R., Santi, P., Martelli, A.M., Maria, B.A., Lo Vasco, V.R., Manzoli, L. and Cocco, L., 2004. Expression of phospholipase C beta family isoenzymes in C2C12 myoblasts during terminal differentiation. *J.Cell Physiol* 200, 291-6.
- Faenza, I., Matteucci, A., Manzoli, L., Billi, A.M., Aluigi, M., Peruzzi, D., Vitale, M., Castorina, S., Suh, P.G. and Cocco, L., 2000. A role for nuclear phospholipase Cbeta 1 in cell cycle control. *J.Biol.Chem.* 275, 30520-4.
- Fanani, M.L., Topham, M.K., Walsh, J.P. and Epanand, R.M., 2004. Lipid modulation of the activity of diacylglycerol kinase alpha- and zeta-isoforms: activation by phosphatidylethanolamine and cholesterol. *Biochemistry* 43, 14767-77.
- Fang, Y., Vilella-Bach, M., Bachmann, R., Flanigan, A. and Chen, J., 2001. Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science* 294, 1942-5.
- Ferreira, P.A. and Pak, W.L., 1994. Bovine phospholipase C highly homologous to the norpA protein of *Drosophila* is expressed specifically in cones. *J.Biol.Chem.* 269, 3129-31.
- Fiume, R., Faenza, I., Matteucci, A., Astolfi, A., Vitale, M., Martelli, A.M. and Cocco, L., 2005. Nuclear phospholipase C beta1 (PLCbeta1) affects CD24 expression in murine erythroleukemia cells. *J.Biol.Chem.* 280, 24221-6.
- Fiume, R., Ramazzotti, G., Teti, G., Chiarini, F., Faenza, I., Mazzotti, G., Billi, A.M. and Cocco, L., 2009. Involvement of nuclear PLCbeta1 in lamin B1 phosphorylation and G2/M cell cycle progression. *FASEB J.* 23, 957-66.
- Fliesler, S.J. and Anderson, R.E., 1983. Chemistry and metabolism of lipids in the vertebrate retina. *Prog.Lipid Res.* 22, 79-131.
- FOLCH, J., LEES, M. and SLOANE STANLEY, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J.Biol.Chem.* 226, 497-509.
- Folli, F., Ghidella, S., Bonfanti, L., Kahn, C.R. and Merighi, A., 1996. The early intracellular signaling pathway for the insulin/insulin-like growth factor receptor family in the mammalian central nervous system. *Mol.Neurobiol.* 13, 155-83.
- Frolich, L., Blum-Degen, D., Bernstein, H.G., Engelsberger, S., Humrich, J., Laufer, S., Muschner, D., Thalheimer, A., Turk, A., Hoyer, S., Zochling, R., Boissl, K.W., Jellinger, K. and Riederer, P., 1998. Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. *J.Neural Transm.* 105, 423-38.

- Fukami, K., Inanobe, S., Kanemaru, K. and Nakamura, Y., 2010. Phospholipase C is a key enzyme regulating intracellular calcium and modulating the phosphoinositide balance. *Prog.Lipid Res.* 49, 429-37.
- Furukawa, T., Morrow, E.M. and Cepko, C.L., 1997. Crx, a novel otx-like homeobox gene, shows photoreceptor-specific expression and regulates photoreceptor differentiation. *Cell* 91, 531-41.
- Gaveglio, V.L., Pasquare, S.J. and Giusto, N.M., 2011. Metabolic pathways for the degradation of phosphatidic acid in isolated nuclei from cerebellar cells. *Arch.Biochem.Biophys.* 507, 271-80.
- Ghalayini, A.J. and Anderson, R.E., 1995. Light adaptation of bovine retinas in situ stimulates phosphatidylinositol synthesis in rod outer segments in vitro. *Curr.Eye Res.* 14, 1025-9.
- Ghalayini, A.J., Tarver, A.P., Mackin, W.M., Koutz, C.A. and Anderson, R.E., 1991. Identification and immunolocalization of phospholipase C in bovine rod outer segments. *J.Neurochem.* 57, 1405-12.
- Ghalayini, A.J., Weber, N.R., Rundle, D.R., Koutz, C.A., Lambert, D., Guo, X.X. and Anderson, R.E., 1998. Phospholipase Cgamma1 in bovine rod outer segments: immunolocalization and light-dependent binding to membranes. *J.Neurochem.* 70, 171-8.
- Ghosh, S., Strum, J.C., Sciorra, V.A., Daniel, L. and Bell, R.M., 1996. Raf-1 kinase possesses distinct binding domains for phosphatidylserine and phosphatidic acid. Phosphatidic acid regulates the translocation of Raf-1 in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-stimulated Madin-Darby canine kidney cells. *J.Biol.Chem.* 271, 8472-80.
- Giusto, N.M. and Ilincheta de Boschero, M.G., 1986. Synthesis of polyphosphoinositides in vertebrate photoreceptor membranes. *Biochim.Biophys.Acta* 877, 440-6.
- Giusto, N.M., Pasquare, S.J., Salvador, G.A., Castagnet, P.I., Roque, M.E. and Ilincheta de Boschero, M.G., 2000. Lipid metabolism in vertebrate retinal rod outer segments. *Prog.Lipid Res.* 39, 315-91.
- Giusto, N.M., Pasquare, S.J., Salvador, G.A. and Ilincheta de Boschero, M.G., 2010. Lipid second messengers and related enzymes in vertebrate rod outer segments. *J.Lipid Res.* 51, 685-700.
- Glottin, A.L., Calipel, A., Brossas, J.Y., Faussat, A.M., Treton, J. and Mascarelli, F., 2006. Sustained versus transient ERK1/2 signaling underlies the anti- and proapoptotic effects of oxidative stress in human RPE cells. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 47, 4614-23.
- Gomes, D.A., Rodrigues, M.A., Leite, M.F., Gomez, M.V., Varnai, P., Balla, T., Bennett, A.M. and Nathanson, M.H., 2008. c-Met must translocate to the nucleus to initiate calcium signals. *J.Biol.Chem.* 283, 4344-51.
- Gordon, W.C. and Bazan, N.G. *Retina. John J.Harding. Biochemistry of the eye. [VI], 144-275. 1997.*

- Gosbell, A.D., Favilla, I., Baxter, K.M. and Jablonski, P., 2000. Insulin receptor and insulin receptor substrate-1 in rat retinae. *Clin.Experiment.Ophthalmol.* 28, 212-5.
- Goto, K., Funayama, M. and Kondo, H., 1994. Cloning and expression of a cytoskeleton-associated diacylglycerol kinase that is dominantly expressed in cerebellum. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91, 13042-6.
- Goto, K., Hozumi, Y. and Kondo, H., 2006. Diacylglycerol, phosphatidic acid, and the converting enzyme, diacylglycerol kinase, in the nucleus. *Biochim.Biophys.Acta* 1761, 535-41.
- Goto, K., Hozumi, Y., Nakano, T., Saino-Saito, S. and Martelli, A.M., 2008. Lipid messenger, diacylglycerol, and its regulator, diacylglycerol kinase, in cells, organs, and animals: history and perspective. *Tohoku J.Exp.Med.* 214, 199-212.
- Goto, K. and Kondo, H., 1993. Molecular cloning and expression of a 90-kDa diacylglycerol kinase that predominantly localizes in neurons. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90, 7598-602.
- Goto, K. and Kondo, H., 1996. A 104-kDa diacylglycerol kinase containing ankyrin-like repeats localizes in the cell nucleus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93, 11196-201.
- Goto, K. and Kondo, H., 1999. Diacylglycerol kinase in the central nervous system--molecular heterogeneity and gene expression. *Chem.Phys.Lipids* 98, 109-17.
- Groop, P.H., Forsblom, C. and Thomas, M.C., 2005. Mechanisms of disease: Pathway-selective insulin resistance and microvascular complications of diabetes. *Nat.Clin.Pract.Endocrinol.Metab* 1, 100-10.
- Guo, X., Ghalayini, A.J., Chen, H. and Anderson, R.E., 1997. Phosphatidylinositol 3-kinase in bovine photoreceptor rod outer segments. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 38, 1873-82.
- Han, X., Zhao, X., Lu, M., Liu, F., Guo, F., Zhang, J., Huang, X., 2013. Electroacupuncture Ameliorates Learning and Memory via Activation of the CREB Signaling Pathway in the Hippocampus to Attenuate Apoptosis after Cerebral Hypoperfusion. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013:156489.
- Havrankova, J., Schmechel, D., Roth, J. and Brownstein, M., 1978. Identification of insulin in rat brain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 75, 5737-41.
- Hetman, M., Kanning, K., Cavanaugh, J.E. and Xia, Z., 1999. Neuroprotection by brain-derived neurotrophic factor is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *J.Biol.Chem.* 274, 22569-80.
- Hennig, A., Peng, G., Chen, S., 2008. Regulation of photoreceptor gene expression by Crx-associated transcription factor network. *Brain Res.* 1192, 114-33.
- Hodgkin, M.N., Pettitt, T.R., Martin, A., Michell, R.H., Pemberton, A.J. and Wakelam, M.J., 1998. Diacylglycerols and phosphatidates: which molecular species are intracellular messengers?. *Trends Biochem.Sci.* 23, 200-4.
- Horgan, A.M. and Stork, P.J., 2003. Examining the mechanism of Erk nuclear translocation using green fluorescent protein. *Exp.Cell Res.* 285, 208-20.

- Houssa, B., Schaap, D., van der Wal, J., Goto, K., Kondo, H., Yamakawa, A., Shibata, M., Takenawa, T. and van Blitterswijk, W.J., 1997. Cloning of a novel human diacylglycerol kinase (DGKtheta) containing three cysteine-rich domains, a proline-rich region, and a pleckstrin homology domain with an overlapping Ras-associating domain. *J.Biol.Chem.* 272, 10422-8.
- Hozumi, Y., Ito, T., Nakano, T., Nakagawa, T., Aoyagi, M., Kondo, H. and Goto, K., 2003. Nuclear localization of diacylglycerol kinase zeta in neurons. *Eur.J.Neurosci.* 18, 1448-57.
- Huang, Z., Ghalayini, A., Guo, X.X., Alvarez, K.M. and Anderson, R.E., 2000. Light-mediated activation of diacylglycerol kinase in rat and bovine rod outer segments. *J.Neurochem.* 75, 355-62.
- Ilincheta de Boschero, M.G. and Giusto, N.M., 1992. Phosphatidic acid and polyphosphoinositide metabolism in rod outer segments. Differential role of soluble and peripheral proteins. *Biochim.Biophys.Acta* 1127, 105-15.
- Imai, S., Kai, M., Yamada, K., Kanoh, H. and Sakane, F., 2004. The plasma membrane translocation of diacylglycerol kinase delta1 is negatively regulated by conventional protein kinase C-dependent phosphorylation at Ser-22 and Ser-26 within the pleckstrin homology domain. *Biochem.J.* 382, 957-66.
- Imai, S., Kai, M., Yasuda, S., Kanoh, H. and Sakane, F., 2005. Identification and characterization of a novel human type II diacylglycerol kinase, DGK kappa. *J.Biol.Chem.* 280, 39870-81.
- Ito, T., Hozumi, Y., Sakane, F., Saino-Saito, S., Kanoh, H., Aoyagi, M., Kondo, H. and Goto, K., 2004. Cloning and characterization of diacylglycerol kinase iota splice variants in rat brain. *J.Biol.Chem.* 279, 23317-26.
- Ivanovic, I., Anderson, R.E., Le, Y.Z., Fliesler, S.J., Sherry, D.M. and Rajala, R.V., 2011. Deletion of the p85alpha regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase in cone photoreceptor cells results in cone photoreceptor degeneration. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 52, 3775-83.
- Jacobs, F.M., van der Heide, L.P., Wijchers, P.J., Burbach, J.P., Hoekman, M.F. and Smidt, M.P., 2003. FoxO6, a novel member of the FoxO class of transcription factors with distinct shuttling dynamics. *J.Biol.Chem.* 278, 35959-67.
- Jenkins, G.H., Fiset, P.L. and Anderson, R.A., 1994. Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase isoforms are specifically stimulated by phosphatidic acid. *J.Biol.Chem.* 269, 11547-54.
- Jeon, C.J., Strettoi, E. and Masland, R.H., 1998. The major cell populations of the mouse retina. *J.Neurosci.* 18, 8936-46.
- Jiang, H., Lyubarsky, A., Dodd, R., Vardi, N., Pugh, E., Baylor, D., Simon, M.I. and Wu, D., 1996. Phospholipase C beta 4 is involved in modulating the visual response in mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93, 14598-601.
- Johannessen, M., Delghandi, M.P., Rykx, A., Dragset, M., Vandenheede, J.R., Van Lint, J., Moens, U., 2007. Protein kinase D induces transcription through direct phosphorylation of the cAMP-response element-binding protein. *J Biol Chem.* 282, 14777-87.

- Johnson-Farley, N.N., Travkina, T. and Cowen, D.S., 2006. Cumulative activation of akt and consequent inhibition of glycogen synthase kinase-3 by brain-derived neurotrophic factor and insulin-like growth factor-1 in cultured hippocampal neurons. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 316, 1062-9.
- Johnston, C.L., Cox, H.C., Gomm, J.J. and Coombes, R.C., 1995. Fibroblast growth factor receptors (FGFRs) localize in different cellular compartments. A splice variant of FGFR-3 localizes to the nucleus. *J.Biol.Chem.* 270, 30643-50.
- Jones, G.A. and Carpenter, G., 1993. The regulation of phospholipase C-gamma 1 by phosphatidic acid. Assessment of kinetic parameters. *J.Biol.Chem.* 268, 20845-50.
- Jones, J.A. and Hannun, Y.A., 2002. Tight binding inhibition of protein phosphatase-1 by phosphatidic acid. Specificity of inhibition by the phospholipid. *J.Biol.Chem.* 277, 15530-8.
- Kai, M., Sakane, F., Imai, S., Wada, I. and Kanoh, H., 1994. Molecular cloning of a diacylglycerol kinase isozyme predominantly expressed in human retina with a truncated and inactive enzyme expression in most other human cells. *J.Biol.Chem.* 269, 18492-8.
- Katagiri, Y., Ito, T., Saino-Saito, S., Hozumi, Y., Suwabe, A., Otake, K., Sata, M., Kondo, H., Sakane, F., Kanoh, H., Kubota, I. and Goto, K., 2005. Expression and localization of diacylglycerol kinase isozymes and enzymatic features in rat lung. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 288, L1171-L1178.
- Keough, K.M., MacDonald, G., Thompson, W., 1972. A possible relation between phosphoinositides and the diglyceride pool in rat brain. *Biochim Biophys Acta.* 270, 337-47.
- Kind, J. and van, S.B., 2010. Genome-nuclear lamina interactions and gene regulation. *Curr.Opin.Cell Biol.* 22, 320-5.
- Kishikawa, K., Chalfant, C.E., Perry, D.K., Bielawska, A. and Hannun, Y.A., 1999. Phosphatidic acid is a potent and selective inhibitor of protein phosphatase 1 and an inhibitor of ceramide-mediated responses. *J.Biol.Chem.* 274, 21335-41.
- Klauck, T.M., Xu, X., Mousseau, B. and Jaken, S., 1996. Cloning and characterization of a glucocorticoid-induced diacylglycerol kinase. *J.Biol.Chem.* 271, 19781-8.
- Knauss, T.C., Jaffer, F.E. and Abboud, H.E., 1990. Phosphatidic acid modulates DNA synthesis, phospholipase C, and platelet-derived growth factor mRNAs in cultured mesangial cells. Role of protein kinase C. *J.Biol.Chem.* 265, 14457-63.
- Kobayashi, N., Hozumi, Y., Ito, T., Hosoya, T., Kondo, H. and Goto, K., 2007. Differential subcellular targeting and activity-dependent subcellular localization of diacylglycerol kinase isozymes in transfected cells. *Eur.J.Cell Biol.* 86, 433-44.
- Koch, K.W. and Kaupp, U.B., 1985. Cyclic GMP directly regulates a cation conductance in membranes of bovine rods by a cooperative mechanism. *J.Biol.Chem.* 260, 6788-800.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.

- Ledeen, R.W. and Wu, G., 2004. Nuclear lipids: key signaling effectors in the nervous system and other tissues. *J.Lipid Res.* 45, 1-8.
- Lee, C.W., Park, D.J., Lee, K.H., Kim, C.G. and Rhee, S.G., 1993. Purification, molecular cloning, and sequencing of phospholipase C-beta 4. *J.Biol.Chem.* 268, 21318-27.
- Li, G., Anderson, R.E., Tomita, H., Adler, R., Liu, X., Zack, D.J. and Rajala, R.V., 2007. Nonredundant role of Akt2 for neuroprotection of rod photoreceptor cells from light-induced cell death. *J.Neurosci.* 27, 203-11.
- Li, G., Rajala, A., Wiechmann, A.F., Anderson, R.E. and Rajala, R.V., 2008. Activation and membrane binding of retinal protein kinase Balpha/Akt1 is regulated through light-dependent generation of phosphoinositides. *J.Neurochem.* 107, 1382-97.
- Lidke, D.S., Huang, F., Post, J.N., Rieger, B., Wilsbacher, J., Thomas, J.L., Pouyssegur, J., Jovin, T.M. and Lenormand, P., 2010. ERK nuclear translocation is dimerization-independent but controlled by the rate of phosphorylation. *J.Biol.Chem.* 285, 3092-102.
- Limatola, C., Schaap, D., Moolenaar, W.H. and van Blitterswijk, W.J., 1994. Phosphatidic acid activation of protein kinase C-zeta overexpressed in COS cells: comparison with other protein kinase C isotypes and other acidic lipids. *Biochem.J.* 304 (Pt 3), 1001-8.
- Lin, S.Y., Makino, K., Xia, W., Matin, A., Wen, Y., Kwong, K.Y., Bourguignon, L. and Hung, M.C., 2001. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat.Cell Biol.* 3, 802-8.
- Liu, N., Fukami, K., Yu, H. and Takenawa, T., 1996. A new phospholipase C delta 4 is induced at S-phase of the cell cycle and appears in the nucleus. *J.Biol.Chem.* 271, 355-60.
- Liu, B., Barbosa-Sampaio, H., Jones, P.M., Persaud, S.J., Muller, D.S., 2012. The CaMK4/CREB/IRS-2 cascade stimulates proliferation and inhibits apoptosis of β -cells. *PLoS One.* 7, e45711.
- Loewen, C.J., Gaspar, M.L., Jesch, S.A., Delon, C., Ktistakis, N.T., Henry, S.A. and Levine, T.P., 2004. Phospholipid metabolism regulated by a transcription factor sensing phosphatidic acid. *Science* 304, 1644-7.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 193, 265-75.
- Lucas, P., Ukhanov, K., Leinders-Zufall, T. and Zufall, F., 2003. A diacylglycerol-gated cation channel in vomeronasal neuron dendrites is impaired in TRPC2 mutant mice: mechanism of pheromone transduction. *Neuron* 40, 551-61.
- Luo, B., Prescott, S.M. and Topham, M.K., 2003. Association of diacylglycerol kinase zeta with protein kinase C alpha: spatial regulation of diacylglycerol signaling. *J.Cell Biol.* 160, 929-37.
- Luo, B., Regier, D.S., Prescott, S.M. and Topham, M.K., 2004. Diacylglycerol kinases. *Cell Signal.* 16, 983-9.

- Marchi, M., Parra, R., Costa, M. and Ratto, G.M., 2010. Localization and trafficking of fluorescently tagged ERK1 and ERK2. *Methods Mol.Biol.* 661, 287-301.
- Marmioli, S., Bertacchini, J., Beretti, F., Cenni, V., Guida, M., De, P.A., Maraldi, N.M. and Lattanzi, G., 2009. A-type lamins and signaling: the PI 3-kinase/Akt pathway moves forward. *J.Cell Physiol* 220, 553-61.
- Martelli, A.M., Evangelisti, C., Nyakern, M. and Manzoli, F.A., 2006. Nuclear protein kinase C. *Biochim.Biophys.Acta* 1761, 542-51.
- Martelli, A.M., Faenza, I., Billi, A.M., Fala, F., Cocco, L. and Manzoli, L., 2003. Nuclear protein kinase C isoforms: key players in multiple cell functions? *Histol.Histopathol.* 18, 1301-12.
- Martelli, A.M., Fala, F., Faenza, I., Billi, A.M., Cappellini, A., Manzoli, L. and Cocco, L., 2004. Metabolism and signaling activities of nuclear lipids. *Cell Mol.Life Sci.* 61, 1143-56.
- Martelli, A.M., Gilmour, R.S., Bertagnolo, V., Neri, L.M., Manzoli, L. and Cocco, L., 1992. Nuclear localization and signalling activity of phosphoinositidase C beta in Swiss 3T3 cells. *Nature* 358, 242-5.
- Matsubara, T., Shirai, Y., Miyasaka, K., Murakami, T., Yamaguchi, Y., Ueyama, T., Kai, M., Sakane, F., Kanoh, H., Hashimoto, T., Kamada, S., Kikkawa, U. and Saito, N., 2006. Nuclear transportation of diacylglycerol kinase gamma and its possible function in the nucleus. *J.Biol.Chem.* 281, 6152-64.
- Moritz, A., De Graan, P.N., Gispén, W.H. and Wirtz, K.W., 1992. Phosphatidic acid is a specific activator of phosphatidylinositol-4-phosphate kinase. *J.Biol.Chem.* 267, 7207-10.
- Morrow, E., Furukawa, T., Lee, J., Cepko, C., 1999. NeuroD regulates multiple functions in the developing neural retina in rodent. *Development.* 126, 23–36.
- Murakami, T., Sakane, F., Imai, S., Houkin, K. and Kanoh, H., 2003. Identification and characterization of two splice variants of human diacylglycerol kinase eta. *J.Biol.Chem.* 278, 34364-72.
- Nagaya, H., Wada, I., Jia, Y.J. and Kanoh, H., 2002. Diacylglycerol kinase delta suppresses ER-to-Golgi traffic via its SAM and PH domains. *Mol.Biol.Cell* 13, 302-16.
- Naqvi, S., Martin, K.J., Arthur, J.S., 2014. CREB phosphorylation at Ser133 regulates transcription via distinct mechanisms downstream of cAMP and MAPK signalling. *Biochem J.* 458, 469-79.
- Natalini, P.M., Zulian, S.E., Ilincheta de Boschero, M.G. and Giusto, N.M., 2013. Diacylglycerol kinase epsilon in bovine and rat photoreceptor cells. Light-dependent distribution in photoreceptor cells. *Exp.Eye Res.* 112, 139-50.
- Narimatsu, T., Ozawa, Y., Miyake, S., Kubota, S., Hirasawa, M., Nagai, N., Shimmura, S., Tsubota, K., 2013. Disruption of cell-cell junctions and induction of pathological cytokines in the retinal pigment epithelium of light-exposed mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 54, 4555-62.

- Neri, L.M., Billi, A.M., Manzoli, L., Rubbini, S., Gilmour, R.S., Cocco, L. and Martelli, A.M., 1994. Selective nuclear translocation of protein kinase C alpha in Swiss 3T3 cells treated with IGF-I, PDGF and EGF. *FEBS Lett.* 347, 63-8.
- Newton, A.C., 1997. Regulation of protein kinase C. *Curr.Opin.Cell Biol.* 9, 161-7.
- Newton, A.C., 2009. Lipid activation of protein kinases. *J.Lipid Res.* 50 Suppl, S266-S271.
- Newton, A.C., 2010. Protein kinase C: poised to signal. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 298, E395-E402.
- Nielsen, D., Gyllberg, H., Ostlund, P., Bergman, T. and Bedecs, K., 2004. Increased levels of insulin and insulin-like growth factor-1 hybrid receptors and decreased glycosylation of the insulin receptor alpha- and beta-subunits in scrapie-infected neuroblastoma N2a cells. *Biochem.J.* 380, 571-9.
- Nishizuka, Y., 1995. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* 9, 484-96.
- Olson, E.N., Burgess, R. and Staudinger, J., 1993. Protein kinase C as a transducer of nuclear signals. *Cell Growth Differ.* 4, 699-705.
- Orisme, W., Li, J., Goldmann, T., Bolch, S., Wolfrum, U. and Smith, W.C., 2010. Light-dependent translocation of arrestin in rod photoreceptors is signaled through a phospholipase C cascade and requires ATP. *Cell Signal.* 22, 447-56.
- Pasquare de Garcia, S.J. and Giusto, N.M., 1986. Phosphatidate phosphatase activity in isolated rod outer segment from bovine retina. *Biochim.Biophys.Acta* 875, 195-202.
- Pasquare, S.J. and Giusto, N.M., 1993. Differential properties of phosphatidate phosphohydrolase and diacylglyceride lipase activities in retinal subcellular fractions and rod outer segments. *Comp Biochem.Physiol B* 104, 141-8.
- Payraastre, B., Nievers, M., Boonstra, J., Breton, M., Verkleij, A.J. and Van Bergen en Henegouwen PM, 1992. A differential location of phosphoinositide kinases, diacylglycerol kinase, and phospholipase C in the nuclear matrix. *J.Biol.Chem.* 267, 5078-84.
- Pennesi, M.E., Cho, J.H., Yang, Z., Wu, S.H., Zhang, J., Wu, S.M., Tsai, M.J., 2003 BETA2/NeuroD1 null mice: a new model for transcription factor-dependent photoreceptor degeneration. *J Neurosci.* 23, 453-461.
- Petkova, D.H., Nikolova, M.N., Momchilova-Pankova, A.B. and Koumanov, K.S., 1990. Insulin effect on the phospholipid organization and some enzyme activities of rat liver membrane fractions. *Comp Biochem.Physiol B* 95, 685-9.
- Pettitt, T.R. and Wakelam, M.J., 1999. Diacylglycerol kinase epsilon, but not zeta, selectively removes polyunsaturated diacylglycerol, inducing altered protein kinase C distribution in vivo. *J.Biol.Chem.* 274, 36181-6.
- Piazzzi, M., Blalock, W.L., Bavelloni, A., Faenza, I., D'Angelo, A., Maraldi, N.M. and Cocco, L., 2013. Phosphoinositide-specific phospholipase C beta 1b (PI-PLCbeta1b) interactome: affinity purification-mass spectrometry analysis of PI-PLCbeta1b with nuclear protein. *Mol.Cell Proteomics.* 12, 2220-35.

- Pinzon-Guzman, C., Zhang, S.S. and Barnstable, C.J., 2011. Specific protein kinase C isoforms are required for rod photoreceptor differentiation. *J.Neurosci.* 31, 18606-17.
- Podlecki, D.A., Smith, R.M., Kao, M., Tsai, P., Huecksteadt, T., Brandenburg, D., Lasher, R.S., Jarett, L. and Olefsky, J.M., 1987. Nuclear translocation of the insulin receptor. A possible mediator of insulin's long term effects. *J.Biol.Chem.* 262, 3362-8.
- Raingeaud, J., Gupta, S., Rogers, J.S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R.J. and Davis, R.J., 1995. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J.Biol.Chem.* 270, 7420-6.
- Rajala, A., Anderson, R.E., Ma, J.X., Lem, J., Al-Ubaidi, M.R. and Rajala, R.V., 2007. G-protein-coupled receptor rhodopsin regulates the phosphorylation of retinal insulin receptor. *J.Biol.Chem.* 282, 9865-73.
- Rajala, A., Daly, R.J., Tanito, M., Allen, D.T., Holt, L.J., Lobanova, E.S., Arshavsky, V.Y. and Rajala, R.V., 2009. Growth factor receptor-bound protein 14 undergoes light-dependent intracellular translocation in rod photoreceptors: functional role in retinal insulin receptor activation. *Biochemistry* 48, 5563-72.
- Rajala, A., Dighe, R., Agbaga, M.P., Anderson, R.E. and Rajala, R.V., 2013. Insulin receptor signaling in cones. *J.Biol.Chem.* 288, 19503-15.
- Rajala, A., Tanito, M., Le, Y.Z., Kahn, C.R. and Rajala, R.V., 2008. Loss of neuroprotective survival signal in mice lacking insulin receptor gene in rod photoreceptor cells. *J.Biol.Chem.* 283, 19781-92.
- Rajala, R.V., Chan, M.D. and Rajala, A., 2005. Lipid-protein interactions of growth factor receptor-bound protein 14 in insulin receptor signaling. *Biochemistry* 44, 15461-71.
- Rajala, R.V., McClellan, M.E., Ash, J.D. and Anderson, R.E., 2002. In vivo regulation of phosphoinositide 3-kinase in retina through light-induced tyrosine phosphorylation of the insulin receptor beta-subunit. *J.Biol.Chem.* 277, 43319-26.
- Reilly, J.F. and Maher, P.A., 2001. Importin beta-mediated nuclear import of fibroblast growth factor receptor: role in cell proliferation. *J.Cell Biol.* 152, 1307-12.
- Reiter, C.E., Sandirasegarane, L., Wolpert, E.B., Klinger, M., Simpson, I.A., Barber, A.J., Antonetti, D.A., Kester, M. and Gardner, T.W., 2003. Characterization of insulin signaling in rat retina in vivo and ex vivo. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 285, E763-E774.
- Robertson, D.M., Zhu, M. and Wu, Y.C., 2012. Cellular distribution of the IGF-1R in corneal epithelial cells. *Exp.Eye Res.* 94, 179-86.
- Rodrigues, M.A., Gomes, D.A., Andrade, V.A., Leite, M.F. and Nathanson, M.H., 2008. Insulin induces calcium signals in the nucleus of rat hepatocytes. *Hepatology* 48, 1621-31.
- Rodriguez de Turco, E.B., Tang, W., Topham, M.K., Sakane, F., Marcheselli, V.L., Chen, C., Taketomi, A., Prescott, S.M. and Bazan, N.G., 2001. Diacylglycerol kinase epsilon regulates seizure susceptibility and long-term potentiation through arachidonoyl- inositol lipid signaling. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 4740-5.

- Ron, D. and Kazanietz, M.G., 1999. New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *FASEB J.* 13, 1658-76.
- Roque, M.E. and Giusto, N.M., 1995. Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase activity in isolated rod outer segments from bovine retina. *Exp.Eye Res.* 60, 631-43.
- Rosenberger, U., Shakibaei, M. and Buchner, K., 1995. Localization of non-conventional protein kinase C isoforms in bovine brain cell nuclei. *Biochem.J.* 305 (Pt 1), 269-75.
- Saenz-de-Viteri, M., Heras-Mulero, H., Fernández-Robredo, P., Recalde, S., Hernández, M., Reiter, N., Moreno-Orduña, M., García-Layana, A., 2014. Oxidative stress and histological changes in a model of retinal phototoxicity in rabbits. *Oxid Med Cell Longev.* 2014, 637137.
- Sakane, F., Imai, S., Kai, M., Wada, I. and Kanoh, H., 1996. Molecular cloning of a novel diacylglycerol kinase isozyme with a pleckstrin homology domain and a C-terminal tail similar to those of the EPH family of protein-tyrosine kinases. *J.Biol.Chem.* 271, 8394-401.
- Sakane, F., Imai, S., Yamada, K., Murakami, T., Tsushima, S. and Kanoh, H., 2002. Alternative splicing of the human diacylglycerol kinase delta gene generates two isoforms differing in their expression patterns and in regulatory functions. *J.Biol.Chem.* 277, 43519-26.
- Sakane, F., Yamada, K., Kanoh, H., Yokoyama, C. and Tanabe, T., 1990. Porcine diacylglycerol kinase sequence has zinc finger and E-F hand motifs. *Nature* 344, 345-8.
- Salvador, G.A. and Giusto, N.M., 2006. Phospholipase D from photoreceptor rod outer segments is a downstream effector of RhoA: evidence of a light-dependent mechanism. *Exp.Eye Res.* 83, 202-11.
- Salvador, G.A., Ilincheta de Boscherio, M.G., Pasquare, S.J. and Giusto, N.M., 2005. Phosphatidic acid and diacylglycerol generation is regulated by insulin in cerebral cortex synaptosomes from adult and aged rats.. *J.Neurosci.Res.* 81, 244-52.
- Santi, S.A. and Lee, H., 2010. The Akt isoforms are present at distinct subcellular locations. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 298, C580-C591.
- Sarfstein, R., Pasmanik-Chor, M., Yeheskel, A., Edry, L., Shomron, N., Warman, N., Wertheimer, E., Maor, S., Shochat, L. and Werner, H., 2012. Insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) translocates to nucleus and autoregulates IGF-IR gene expression in breast cancer cells. *J.Biol.Chem.* 287, 2766-76.
- Schaap, D., de, W.J., van der Wal, J., Vandekerckhove, J., van, D.J., Gussow, D., Ploegh, H.L., van Blitterswijk, W.J. and van der Bend, R.L., 1990. Purification, cDNA-cloning and expression of human diacylglycerol kinase. *FEBS Lett.* 275, 151-8.
- Schachter, T.N., Shen, T., Liu, Y., Schneider, M.F., 2012. Kinetics of nuclear-cytoplasmic translocation of Foxo1 and Foxo3A in adult skeletal muscle fibers. *Am J Physiol Cell Physiol.* 303, C977-90.
- Scheid, M.P., Parsons, M. and Woodgett, J.R., 2005. Phosphoinositide-dependent phosphorylation of PDK1 regulates nuclear translocation. *Mol.Cell Biol.* 25, 2347-63.

- Seol, K.C. and Kim, S.J., 2003. Nuclear matrix association of insulin receptor and IRS-1 by insulin in osteoblast-like UMR-106 cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 306, 898-904.
- Shankar, E., Krishnamurthy, S., Paranandi, R., Basu, A., 2010. PKCepsilon induces Bcl-2 by activating CREB. *Int J Oncol.* 36, 883-8.
- Shin, T., Kim, S., Ahn, M. and Kim, H., 2006. An immunohistochemical study of protein kinase C in the bovine retina. *J.Vet.Med.Sci.* 68, 71-4.
- Slepak, V.Z. and Hurley, J.B., 2008. Mechanism of light-induced translocation of arrestin and transducin in photoreceptors: interaction-restricted diffusion. *IUBMB.Life* 60, 2-9.
- Sokolov, M., Lyubarsky, A.L., Strissel, K.J., Savchenko, A.B., Govardovskii, V.I., Pugh, E.N. Jr, Arshavsky, V.Y., 2002. Massive light-driven translocation of transducin between the two major compartments of rod cells: a novel mechanism of light adaptation. *Neuron.* 34, 95-106.
- Solovei, I., Kreysing, M., Lanctot, C., Kosem, S., Peichl, L., Cremer, T., Guck, J. and Joffe, B., 2009. Nuclear architecture of rod photoreceptor cells adapts to vision in mammalian evolution. *Cell* 137, 356-68.
- Sone, Y., Ito, M., Shirakawa, H., Shikano, T., Takeuchi, H., Kinoshita, K. and Miyazaki, S., 2005. Nuclear translocation of phospholipase C-zeta, an egg-activating factor, during early embryonic development. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 330, 690-4.
- Srinivasan, S., Ohsugi, M., Liu, Z., Fatrai, S., Bernal-Mizrachi, E. and Permutt, M.A., 2005. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis is partly mediated by reduced insulin signaling through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and increased glycogen synthase kinase-3beta in mouse insulinoma cells. *Diabetes* 54, 968-75.
- Sweatt, J.D., 2001. The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J.Neurochem.* 76, 1-10.
- Sweatt, J.D., 2004. Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr.Opin.Neurobiol.* 14, 311-7.
- Takahashi, M., Yamada, T., Tooyama, I., Moroo, I., Kimura, H., Yamamoto, T. and Okada, H., 1996. Insulin receptor mRNA in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci.Lett.* 204, 201-4.
- Takai, Y., Sasaki, T. and Matozaki, T., 2001. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev.* 81, 153-208.
- Takeuchi, H., Kanematsu, T., Misumi, Y., Sakane, F., Konishi, H., Kikkawa, U., Watanabe, Y., Katan, M. and Hirata, M., 1997. Distinct specificity in the binding of inositol phosphates by pleckstrin homology domains of pleckstrin, RAC-protein kinase, diacylglycerol kinase and a new 130 kDa protein. *Biochim.Biophys.Acta* 1359, 275-85.
- Tamiya-Koizumi, K., 2002. Nuclear lipid metabolism and signaling. *J.Biochem.* 132, 13-22.

- Tanito, M., Li, F., Elliott, M.H., Dittmar, M., Anderson, R.E., 2007. Protective effect of TEMPOL derivatives against light-induced retinal damage in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48, 1900-5.
- Tang, W., Bunting, M., Zimmerman, G.A., McIntyre, T.M. and Prescott, S.M., 1996. Molecular cloning of a novel human diacylglycerol kinase highly selective for arachidonate-containing substrates. *J.Biol.Chem.* 271, 10237-41.
- Tatin, F., Grise, F., Reuzeau, E., Genot, E., Moreau, V., 2010. Sodium fluoride induces podosome formation in endothelial cells. *Biol Cell.* 102, 489-98.
- Thirugnanam, S., Topham, M.K. and Epand, R.M., 2001. Physiological implications of the contrasting modulation of the activities of the epsilon- and zeta-isoforms of diacylglycerol kinase. *Biochemistry* 40, 10607-13.
- Topham, M.K., 2006. Signaling roles of diacylglycerol kinases. *J.Cell Biochem.* 97, 474-84.
- Topham, M.K., Bunting, M., Zimmerman, G.A., McIntyre, T.M., Blackshear, P.J. and Prescott, S.M., 1998. Protein kinase C regulates the nuclear localization of diacylglycerol kinase-zeta. *Nature* 394, 697-700.
- Topham, M.K. and Prescott, S.M., 1999. Mammalian diacylglycerol kinases, a family of lipid kinases with signaling functions. *J.Biol.Chem.* 274, 11447-50.
- Tsai, M.H., Yu, C.L. and Stacey, D.W., 1990. A cytoplasmic protein inhibits the GTPase activity of H-Ras in a phospholipid-dependent manner. *Science* 250, 982-5.
- Ullrich, A., Bell, J.R., Chen, E.Y., Herrera, R., Petruzzelli, L.M., Dull, T.J., Gray, A., Coussens, L., Liao, Y.C., Tsubokawa, M. and ., 1985. Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature* 313, 756-61.
- Ullrich, A., Gray, A., Tam, A.W., Yang-Feng, T., Tsubokawa, M., Collins, C., Henzel, W., Le, B.T., Kathuria, S., Chen, E. and ., 1986. Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J.* 5, 2503-12.
- Uranga, R.M., Mateos, M.V., Giusto, N.M. and Salvador, G.A., 2007. Activation of phosphoinositide-3 kinase/Akt pathway by FeSO₄ in rat cerebral cortex synaptic endings. *J.Neurosci.Res.* 85, 2924-32.
- van Baal J., de, W.J., Divecha, N. and van Blitterswijk, W.J., 2005. Translocation of diacylglycerol kinase theta from cytosol to plasma membrane in response to activation of G protein-coupled receptors and protein kinase C. *J.Biol.Chem.* 280, 9870-8.
- van Blitterswijk, W.J., Houssa, B., 2000. Properties and functions of diacylglycerol kinases. *Cell Signal.* 12, 595-605.
- van der Heide, L.P., Ramakers, G.M. and Smidt, M.P., 2006. Insulin signaling in the central nervous system: learning to survive. *Prog.Neurobiol.* 79, 205-21.
- Vincent, S., Brouns, M., Hart, M.J., Settleman, J., 1998. Evidence for distinct mechanisms of transition state stabilization of GTPases by fluoride. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 2210-5.

- Wada, I., Kai, M., Imai, S., Sakane, F. and Kanoh, H., 1996. Translocation of diacylglycerol kinase alpha to the nuclear matrix of rat thymocytes and peripheral T-lymphocytes. *FEBS Lett.* 393, 48-52.
- Walker, A.J., Draeger, A., Houssa, B., van Blitterswijk, W.J., Ohanian, V. and Ohanian, J., 2001. Diacylglycerol kinase theta is translocated and phosphoinositide 3-kinase-dependently activated by noradrenaline but not angiotensin II in intact small arteries. *Biochem.J.* 353, 129-37.
- Walsh, J.P., Suen, R. and Glomset, J.A., 1995. Arachidonoyl-diacylglycerol kinase. Specific in vitro inhibition by polyphosphoinositides suggests a mechanism for regulation of phosphatidylinositol biosynthesis. *J.Biol.Chem.* 270, 28647-53.
- Xu, A., Wang, Y., Xu, L.Y. and Gilmour, R.S., 2001. Protein kinase C alpha -mediated negative feedback regulation is responsible for the termination of insulin-like growth factor I-induced activation of nuclear phospholipase C beta1 in Swiss 3T3 cells. *J.Biol.Chem.* 276, 14980-6.
- Yahagi, H., Takeda, M., Asaumi, Y., Okumura, K., Takahashi, R., Takahashi, J., Ohta, J., Tada, H., Minatoya, Y., Sakuma, M., Watanabe, J., Goto, K., Shirato, K. and Kagaya, Y., 2005. Differential regulation of diacylglycerol kinase isozymes in cardiac hypertrophy. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 332, 101-8.
- Yamada, K., Sakane, F., Matsushima, N. and Kanoh, H., 1997. EF-hand motifs of alpha, beta and gamma isoforms of diacylglycerol kinase bind calcium with different affinities and conformational changes. *Biochem.J.* 321 (Pt 1), 59-64.
- Yamaga, M., Fujii, M., Kamata, H., Hirata, H. and Yagisawa, H., 1999. Phospholipase C-delta1 contains a functional nuclear export signal sequence. *J.Biol.Chem.* 274, 28537-41.
- Yokoo, H., Sugano, T., Satoh, S., Yanagita, T., Kobayashi, H. and Wada, A., 2005. [Expression of insulin receptor and its signaling molecules: regulatory mechanisms in neuronal cells]. *Nihon Yakurigaku Zasshi* 125, 141-6.
- Yoon, S. and Seger, R., 2006. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 24, 21-44.
- Zehorai, E., Yao, Z., Plotnikov, A. and Seger, R., 2010. The subcellular localization of MEK and ERK--a novel nuclear translocation signal (NTS) paves a way to the nucleus. *Mol.Cell Endocrinol.* 314, 213-20.
- Zulian, S.E., de Boschero, M.G. and Giusto, N.M., 2009. Insulin action on polyunsaturated phosphatidic acid formation in rat brain: an "in vitro" model with synaptic endings from cerebral cortex and hippocampus. *Neurochem.Res.* 34, 1236-48.
- Zulian, S.E., Ilincheta de Boschero, M.G. and Giusto, N.M., 2006. Insulin promotes diacylglycerol kinase activation by different mechanisms in rat cerebral cortex synaptosomes. *J.Neurosci.Res.* 84, 1012-9.
- Zulian, S.E., Ilincheta de Boschero, M.G. and Giusto, N.M., 2011. Insulin modifies aging-related inhibition of 1-stearoyl, 2-arachidonoylglycerol phosphorylation in rat synaptic terminals. *Neurochem.Int.* 58, 330-6.

Las publicaciones derivadas de los resultados reportados en esta tesis doctoral son:

- **“Diacylglycerol kinase epsilon in bovine and rat photoreceptor cells. Light-dependent distribution in photoreceptor cell.”** Natalini P.*, Zulian S.*, Ilincheta de Boscherio M., Giusto N., Exp Eye Res 2013. Julio; 112: 139-50.
- **“A Novel light-dependent activation of DAGK and PKC in Rod Photoreceptor Nuclei.”** Natalini P., Mateos M., Ilincheta de Boscherio M., Giusto N. Exp Eye Res 2014. Agosto; 125: 142-55.

Presentaciones a congresos

- **Natalini, P.M.**, Zulian, S.E., Giusto, N.M., Ilincheta de Boschero, M.G. “Presencia de Diacilglicerol Kinasa Dzeta en los núcleos de la retina de Vertebrados”. VII Congreso Nacional de Investigación En Visión y Oftalmología (AIVO). 19 y 20 de noviembre de 2010. Córdoba, Argentina. Pág. 38.
- Zulian, S.E., **Natalini, P.M.**, Ilincheta de Boschero, M.G., Giusto, N.M. “La Translocación de la Diacilglicerol Kinasa (DAGK) y su activación por PKC como reguladora de la translocación de arrestina en segmentos externos de vertebrados”. LV Reunión Científica Anual de la SAIC, Reunión Anual de la SAFIS y XLII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental. 17-20 de noviembre de 2010. Mar del Plata, Argentina. Pág. 187.
- **Natalini, P.M.**, Zulian, S.E., Giusto, N.M., Ilincheta de Boschero, M.G. “Presencia de Diacilglicerol Kinasa Dzeta en los núcleos de la retina de Vertebrados”. II Jornadas de Postgrado del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia. Diciembre de 2010.
- **Natalini, P.M.**, Zulian, S.E., Giusto, N.M., Ilincheta de Boschero, M.G. “Light-dependent DAGK activity in a purified photoreceptor nuclear fraction from bovine retinas” XLVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). 30 de octubre al 2 de noviembre del 2011. Potrero de los Funes, San Luis, Argentina. Pág. 126.
- **Natalini P.M.**, Zulian S.E., Ilincheta de Boschero M.G., Giusto N.M. “El contenido y la actividad DAGK de una fracción nuclear de fotorreceptores, altamente purificada, son modulados por la exposición de las retinas a la luz”. V Jornadas de bioquímica y biología molecular de lípidos y lipoproteínas. 10-11 de julio del 2012. Ciudad autónoma de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. Pág. 31.
- **Natalini P.M.**, Zulian S.E., Ilincheta de Boschero M.G., Giusto N.M. “Fosforilación de Diacilglicerol (DAG) y fosfatidilinositol (PI) en sinaptosomas de hipocampo (HP) de rata expuestos a beta amiloide”. V Jornadas de bioquímica y biología molecular de lípidos y lipoproteínas. 10-11 de julio del 2012. Ciudad autónoma de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. Pág. 67.
- **Natalini, P.M.**, Mateos M.V., S.E., Giusto, N.M., Ilincheta de Boschero, M.G. “La exposición de las retinas bovinas a la luz modula positivamente la activación de la proteína quinasa C alfa (PKC α) y de la diacilglicerol quinasa (DAGK) en la fracción nuclear de fotorreceptores”. IX Congreso Nacional de Investigación En Visión y Oftalmología (AIVO). 23 y 24 de noviembre de 2012. Buenos Aires, Argentina, Pág. 24.

- **Natalini P.M.**, Zulian S.E., Ilincheta de Boscherio M.G., Giusto N.M. “El contenido y la actividad DAGK de la fracción nuclear de fotorreceptores, altamente purificada, son modulados por la exposición de las retinas a la luz”. III Jornadas de Postgrado del departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia. Octubre de 2012. Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina.
- **Natalini P.M.**, Mateos M.V., Giusto N.M., Ilincheta de Boscherio M.G.” Effect of light on signaling pathways in a photoreceptor cells nuclear fraction from bovine retina. XLIVIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). 4 de noviembre al 6 de noviembre del 2013. Buenos Aires, Argentina. Pág. 47.
- **Natalini P.M.**, Mateos M.V., Giusto N.M., Ilincheta de Boscherio M.G. “Signaling pathways elicited by light in photoreceptor nuclei from bovine retina”. ARVO 2014 Annual Meeting, Leading Eye and Vision Research. 4 al 8 de mayo de 2014. Orlando, Florida, Estados Unidos. Pág. 58.
- **Natalini P.M.**, Mateos M.V., Giusto N.M., Ilincheta de Boscherio M.G. “Insulin receptor: Presence and activation in photoreceptor nuclei from bovine retina”. L Reunión Anual de la Sociedad Argentina de investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Del 11 de noviembre al 14 de noviembre del 2014. Rosario, Argentina. Pág. 187.