



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

**TESIS  
DOCTOR EN BIOQUÍMICA**

**“Actividad de la diacilglicerol quinasa en terminales  
sinápticos de áreas del sistema nervioso central.  
Rol en el mecanismo de señalización de la insulina”.**

**Sandra Edith Zulian**

**BAHIA BLANCA**

**ARGENTINA**

**2008**

***“Dedicado a mis hijos y a mi esposo Claudio  
por ser mi alegría de cada día.  
A mis padres, por enseñarme a valorar la vida”***

***Sandra***

“No importa el tiempo que demores en la  
superación de tí mismo, lo importante es  
que lo logres...”

Leonardo Da Vinci

(Máxima de Leonardo Da Vinci dedicada por  
mi padre al iniciar mis estudios  
universitarios)

## *Prefacio*

---

“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 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 septiembre de 2004 y el 31 de marzo de 2009, bajo la dirección de la Dra. Norma María Giusto, Profesora Titular de Química Biológica II y la co-dirección de la Dra. Mónica Graciela Ilincheta de Boschero, Profesora Adjunta de Química Medicinal”.

El presente trabajo de tesis fue financiado con subsidios otorgados por el CONICET (PIP N°5539), por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 01-14527 y por la UNS (24/B137), a quienes agradezco por hacer posible la realización de esta tesis.

---

## *Agradecimientos*

---

Quiero agradecer al INIBIBB, por el soporte institucional, al CONICET por financiar mis estudios de postgrado y a la UNS por brindarme la posibilidad de estudiar una carrera...

Agradezco muy especialmente a mi directora de tesis, la Dra. Norma Giusto, por su generosidad, por su capacidad y experiencia científica, por su confianza, respeto y afecto, fundamentales para la realización de este trabajo...

A mi co-directora, la Dra. Mónica Ilincheta, "Moni", por su predisposición permanente e incondicional, por su insuperable optimismo, por sus valiosas sugerencias en la mesada y fuera de ella, por estar siempre y fundamentalmente por su gran calidad humana...

A mis compañeras del laboratorio, Meli, Virginia, Romina, Gabriela, Susana, quienes hacen amena la jornada, a Susana González, que siempre nos tiene limpio el material y las ratas "cambiaditas y peinaditas" y a Guillermo y Martín quienes hicieron posible experimentar con ellas...

A mis compañeros de fisicoquímica, siempre dispuestos a tender una mano...

A mis amigas, Meli y Virginia, con quienes siempre puedo contar, mas allá de lo laboral, a Fer, que piso de por medio, seguimos manteniendo una amistad que comenzó siendo estudiantes de Bioquímica...

---

## *Agradecimientos*

---

A mis queridos padres, Jorgelina y Tito, a quienes les debo lo que soy, por apoyarme siempre en cada paso y creer en mis logros. A mis hermanos Omar y Hugo, de quienes recibo siempre una palabra de aliento...

...Y a mis amores, mi querido esposo Claudio y nuestros hijitos Gonzalo y Rodrigo. Claudio, por todos estos años de total entrega, respeto y apoyo, en todo lo que emprendimos juntos y en éste gran proyecto que es nuestra familia; Gonzi y Rodri, nuestros soles, que pacientemente nos esperan en el jardín para llegar a casa...

...y a todos aquellos quienes hicieron posible la concreción de ésta tesis...Gracias!!!

---

# Contenido

---

1	Abreviaturas .....	6
2	Resumen .....	7
3	Abstract.....	10
4	Introducción.....	12
4.1	Isoformas de la DAGK. Estructura y clasificación.....	15
4.2	La DAGK en el sistema nervioso central (SNC) .....	17
4.3	La insulina y el receptor de la insulina. Generalidades .....	19
4.3.1	--- El rol de la insulina en el sistema nervioso central (SNC) .....	19
4.3.2	--- Vías de señalización de la insulina .....	21
4.3.3	--- Acción de la insulina en la actividad de enzimas ligadas a la generación de mensajeros lipídicos en cerebro .....	24
5	Objetivos .....	26
6	Materiales y Métodos .....	27
6.1	Materiales .....	27
6.2	Material Biológico.....	27
6.2.1	--- Obtención de homogenado total de corteza cerebral.....	28
6.2.2	--- Obtención y purificación de sinaptosomas de corteza cerebral y otras fracciones subcelulares .....	28
6.2.3	--- Obtención y purificación de los sinaptosomas de Hipocampo.....	31
6.3	Sustrato enzimático.....	32
6.3.1	--- Obtención de DAG-[ <sup>3</sup> H] de retina bovina.....	32
6.3.1.1	Incubación de las retinas .....	32
6.3.1.2	Medio de incubación.....	33
6.3.1.3	Diseción de la retina.....	33
6.3.1.4	Extracción de lípidos neutros.....	34

---

6.3.1.5	Separación de los lípidos por cromatografía en capa fina (TLC).....	35
6.3.1.6	Visualización de los lípidos.....	36
6.3.2	--- Obtención de DAG-[ <sup>3</sup> H] a partir de la hidrólisis de Triacilglicéridos-[ <sup>3</sup> H] (TAG-[ <sup>3</sup> H]) de retina bovina.....	37
6.4	Análisis de la composición de ácidos grasos del DAG-[ <sup>3</sup> H] .....	38
6.4.1	--- Preparación de metil ésteres de ácidos grasos (FAME).....	38
6.4.2	--- Análisis de los FAME por cromatografía en fase gaseosa (CG).....	38
6.5	Ensayo enzimático para la actividad diacilglicerol quinasa (DAGK).....	39
6.5.1	--- Extracción de lípidos y aislamiento del producto enzimático.....	40
6.5.2	--- Preparación de micelas de lípido-detergente.....	42
6.5.3	--- Análisis de la integridad sinaptosomal.....	43
6.5.3.1	Análisis de la integridad sinaptosomal por TEM.....	43
6.5.3.2	Análisis de la efectividad de incorporación del DAG al sinaptosoma por MF ....	44
6.6	Ensayo de Pulso-Demarcación .....	44
6.6.1	--- Separación de los fosfatos-[ <sup>32</sup> P] de inositol.....	45
6.7	Métodos analíticos .....	47
6.7.1	--- Cuantificación de la radioactividad.....	47
6.7.2	--- Cuantificación de las proteínas.....	47
6.7.2.1	Método de Lowry .....	47
6.7.2.2	Método de Bradford .....	48
6.7.3	--- Inmunodetección de proteínas por “western-blot” .....	48
6.7.3.1	Materiales.....	48
6.7.3.2	Soluciones.....	49
6.7.3.3	Preparación de las muestras .....	49
6.7.3.4	Electroforesis de proteínas .....	49
6.7.3.5	Transferencia e inmunodetección .....	50
6.7.4	--- Inmunodetección de proteínas microscopía de fluorescencia.....	50

---

---

6.7.4.1	Materiales .....	51
6.7.4.2	Soluciones .....	51
6.7.4.3	Preparación de las muestras .....	51
6.8	Métodos estadísticos para analizar los datos experimentales .....	52
7	<i>Resultados</i> .....	54
Capítulo I: Caracterización de la actividad de la DAGK, en sinaptosomas de CC de ratas adultas.....		
7.1	Estudio de las actividades enzimáticas de sinaptosomas de la corteza cerebral de ratas, involucradas en la metabolización del DAG exógeno (DAGe).....	56
7.1.1	--- Efectos de detergentes en la metabolización del DAGe.....	58
7.1.2	--- Dependencia de la actividad DAGK con la concentración de sustrato. ....	60
7.2	Estudio cinético de la actividad DAGK sinaptosomal.....	62
7.2.1	--- Cinética enzimática basal .....	62
7.2.2	--- Cinética enzimática en presencia de DAGs exógenos.....	63
7.3	Comparación de la actividad de la DAGK sobre sustratos de diferente composición en ácido grasos .....	72
7.3.1	--- Estudio de la actividad DAGK en las distintas fracciones subcelulares de corteza cerebral de rata.....	73
Capítulo II: Mecanismo de activación de la DAGK por acción de la insulina, en sinaptosomas de corteza cerebral de ratas adultas .....		
7.4	El aumento de los niveles de DAG por acción de la insulina estimula la actividad de la DAGK.....	80
7.4.1	---- La PI-PLC participa en la activación de la DAGK por efecto de la insulina, aumentando los niveles de DAG.....	81

---

7.4.2 ----	La vía PC-PLD/PAP2 participa en la activación de la DAGK por efecto de la insulina, aumentando los niveles de DAG.....	85
7.4.2.1	- La formación de PA es modificada por la activación de PKC .....	87
7.4.3 ----	La vía PC-PLC no participa en la activación de la DAGK por efecto de la insulina. ....	90
7.5	- La insulina estimula la actividad de la DAGK en forma independiente de la formación de DAG en la membrana.....	92
7.5.1 ----	El SAG no es un regulador positivo para isoformas de DAGK no selectivas de sustrato.....	98
7.5.2 ----	La formación de PA a partir de SAG o DPG, no es afectada por el R59022 y el R59949, inhibidores de la DAGK .....	99
7.6	- Acción de la insulina sobre la actividad de la DAGK sinaptosomal, actuante sobre DPG o SAG. ....	101
7.6.1 ----	Efecto de los inhibidores R59022 y R59949. ....	101
7.6.2 ----	La insulina estimula la síntesis de PA en forma dependiente de la fosforilación en tirosina.....	103
7.6.3 ----	La insulina estimula la síntesis de PA en forma independiente de la fosforilación en serina y treonina .....	105
7.6.4 ----	El NaF y el GTP $\gamma$ S son reguladores positivos del estímulo de la insulina en la formación de PA a partir de SAG y DPG .....	111
7.6.5 ----	La isoforma $\epsilon$ de la DAGK está presente en las preparaciones sinaptosomales de CC.....	116
Capitulo III: Estudio de la activación de la DAGK por acción de la insulina, en el SNC de ratas seniles.....		119
7.7	- Cuantificación de los DAGs en los sinaptosomas de corteza cerebral de ratas seniles .....	120

---

---

7.8 - Actividad de la DAGK en los sinaptosomas de hipocampo de animales adultos y seniles .....	121
7.8.1 ---- Efecto de la insulina sobre la actividad de la DAGK en sinaptosomas de hipocampo de animales adultos y seniles.....	123
8 <i>Discusión</i> .....	128
9 <i>Referencias</i> .....	150
10 <i>Publicaciones</i> .....	171
11 <i>Presentaciones a Congresos</i> .....	172

ATP, adenosina trifosfato  
BIM, bis-indolmaleimida  
CaCl<sub>2</sub>, cloruro de calcio  
D609, Triciclododecan-9-il-xantato (sal de potasio)  
DAG, diacilglicerol  
DAGK, diacilglicerol quinasa  
DMSO, dimetil sulfóxido  
DOC, deoxicolato de sodio  
DOG, 1,2-dioleoilglicerol  
DPG, 1,2-dipalmitoilglicerol  
GTP, guanosina trifosfato  
MAG, monoacilglicerol  
NaF, fluoruro de sodio  
OG,  $\beta$  octilglucósido  
PA, ácido fosfatídico  
PAP, fosfatidato fosfohidrolasa  
PC, fosfatidilcolina  
PDBu, forboldibutirato  
PE, fosfatidiletanolamina  
PIP<sub>2</sub>, fosfatidilinositol bifosfato  
PIP, fosfatidilinositol monofosfato  
PKC, proteína quinasa C  
PLC, proteína lipasa C  
PMA, Phorbol 12-myristate 13-acetate  
PPIs, polifosfoinosítidos  
PS, fosfatidilserina  
R59022, 6-(2-(4-[(4-fluorofenil) fenilmetilen]-1-piperidinil) etil)-7-metil-5H-tiazol (3,2-a) pirimidin-5-ona  
R59949, 3-[2-(4-[bis-(4-fluorofenil) metilen]-1-piperidinil)etil]-2,3-dihidro-2-tioxo-4(1H)quinazolinona  
RN, 9-dietilamino-5H-benzo[ $\alpha$ ]fenoxazina-5-ona  
SAG, 1-estearoil, 2-araquidonoilglicerol  
SDS, dodecil sulfato de sodio  
St, Staurosporina  
TAG, triacilglicerol  
Tritón X-100, octil fenol etoxilato, polioxietilen octil fenil eter  
Vto, orto vanadato de sodio

En los últimos años, numerosos estudios han demostrado que la insulina, a través de la activación de su receptor en el sistema nervioso central (SNC), participa en importantes funciones relacionadas con la plasticidad neuronal, modulando la activación de cascadas de señalización intracelular.

En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio se demostró que la insulina regula vías de transducción de señales lipídicas en el SNC y que dichas vías se encuentran alteradas en el proceso de envejecimiento normal.

En este trabajo de tesis se estudiaron los mecanismos de transducción de señales lipídicas asociados a la vía de señalización de la insulina en el SNC y su rol en el envejecimiento normal. En particular, se evaluó la acción de la insulina como activadora de la diacilglicerol quinasa (DAGK), enzima clave en la regulación de dos importantes mensajeros lipídicos esenciales en la regulación de respuestas celulares como son el ácido fosfatídico (PA) y el diacilglicerol (DAG).

En una primera etapa se llevó a cabo la caracterización de la actividad de DAGK en sinaptosomas de corteza cerebral (CC) de ratas adultas midiendo la actividad sobre DAGs endógenos y exógenos mediante la utilización de detergentes como vehiculizadores del sustrato lipídico DAG. Se estudiaron los parámetros cinéticos a partir de la utilización de DAG endógeno y DAG exógeno de diferente composición en acilos. Se utilizaron como sustratos el 1,2-dipalmitoilglicerol (DPG), el 1-estearoil, 2-araquidonoilglicerol (SAG) y el 1,2-dioleoilglicerol (DOG). Los resultados demostraron que la actividad enzimática utiliza preferencialmente como sustrato el DAG que contiene ácido araquidónico en la posición 2 de la cadena de glicerol (SAG) sugiriendo la presencia, en sinaptosomas de CC, de la isoforma épsilon de la DAGK (DAGK $\epsilon$ ) que es la única selectiva por este tipo de sustrato.

Cuando se analizaron los mecanismos de activación de la DAGK por acción de la insulina, se demostró que la acción hormonal produce un estímulo en la actividad de la enzima a través de dos mecanismos: 1) incrementando los niveles de DAG en la membrana plasmática a partir del estímulo de las vías PI-PLC y PC-PLD/PAP2 lo que determina un aumento en la actividad de la DAGK y 2) estimulando la DAGK en forma directa e independiente de la generación de DAGs en la membrana.

La activación que produce la insulina en forma independiente de la generación de DAGs podría estar asociado a una actividad de DAGK del tipo épsilon (DAGK $\epsilon$ ). Hemos demostrado que la insulina activa la hidrólisis de los fosfoinosítidos que inhiben esta isoforma. Por lo tanto, la activación de la DAGK $\epsilon$  por la insulina estaría promovida por la disminución en el nivel de fosfoinosítidos. A su vez, este efecto podría estar vinculado a la recomposición de éstos lípidos.

En los estudios realizados con membranas sinaptosomales de CC de animales seniles se determinó un aumento en el contenido de DAGs si bien no se registraron modificaciones significativas en la composición de acilos. Este resultado se puede correlacionar con el hallazgo simultáneo de una disminuida actividad DAGK sobre DAGs endógenos.

La utilización de DAGs exógenos de composición saturada (DPG) no presentó modificaciones pero se observó una importante disminución en la capacidad de transformación de SAG. Lo mismo se observó en sinaptosomas de hipocampo.

Se demostró que la insulina, actuando sobre terminales sinápticos de CC, ejerce un efecto estimulador menor con referencia a lo observado en animales adultos en cuanto a la utilización de DPG por la DAGK pero presenta la misma eficacia para incrementar la transformación de SAG.

Llamativamente, la insulina estimula fuertemente la actividad de la DAGK sobre SAG en los sinaptosomas de hipocampo de ratas seniles en comparación con el efecto obtenido en los adultos.

Estos hallazgos sugieren que la acción de la hormona, en cuanto a la recuperación de un PA potencialmente apto como precursor de fosfoinosítidos, podría ser un mecanismo compensatorio en la regulación de la síntesis de estos fosfolípidos y explicaría parcialmente el rol de la hormona como agente neuroprotector.

Several studies have demonstrated through the activation of its central nervous system (CNS) receptor, that insulin has a key role in important functions related to neuronal plasticity, thus modulating the cascade activation of intracellular signaling. In addition, research from our laboratory demonstrates that insulin regulates lipid signal transduction pathways in the SNC, which are altered in the process of normal aging.

The purpose of the present research is to study a lipid signaling pathway associated to the CNS insulin signaling transduction mechanism and its role in normal aging. Particular emphasis is put on the action of insulin as activator of the diacylglycerol kinase (DAGK), a key enzyme in the regulation of two important lipid messengers, namely phosphatidic acid (PA) and diacylglycerol (DAG), both of which are essential molecules in the regulation of cellular responses.

The first stage of this research focused on the characterization of DAGK activity in cerebral cortex synaptosomes of adult rats in order to evaluate its activity in endogenous and exogenous DAGs by means of the use of detergents such as the carrier of lipid substrate DAG.

The kinetic parameters of DAGK activity from endogenous DAG and exogenous DAG with different acyl composition were also studied. We analyzed dipalmitoylglycerol (DPG), 1-stearoyl, 2-arachidonoylglycerol (SAG) and dioleoylglycerol (DOG) as exogenous lipid substrates.

Results show that the enzymatic activity preferentially uses DAG containing arachydonic acid in position 2 of the chain of glycerol (SAG) as substrate, thus indicating the presence of  $\epsilon$  type of DAGK (DAGK $\epsilon$ ) in CC synaptosomes, which is the only type with substrate preferences.

The analysis of DAGK activation by insulin revealed that hormonal action stimulates DAGK activity by means of two mechanisms: 1) by increasing the

levels of DAG in the plasmatic membrane from the stimulus of PI-PLC and PC-PLD/PAP2 pathways, thus producing an increase of DAGK action; and 2) by stimulating DAGK activity in a direct and independent form of DAG generation in the membrane.

It was also found that the stimulus that exerts insulin independently of DAG generation is associated to an epsilon DAGK activity which is possibly regulated by a decrease in phosphoinositide levels and which could be associated to polyphosphoinositides resynthesis.

In CC synaptosomal membranes of senile animals, an increase in DAG content was observed without a significant modification in acyl composition. This can be correlated with the simultaneous finding of a decreased DAGK activity in endogenous DAGs.

Whereas the use of saturated exogenous DAG (DPG) showed no modifications by aging, an important decrease in DAGK ability to transform SAG into PA was observed. A similar result was observed in synaptosomes from hippocampus.

It was also observed that insulin acting in CC synaptic terminals exerted a minor stimulatory effect with respect to adult animals in DPG transformation, whereas it showed the same effectiveness to increase SAG transformation. Interestingly, insulin strongly stimulated DAGK activity in SAG in hippocampus synaptosomes of senile rats with respect to adults.

As to the recovery of a PA with the potential ability to be phosphoinositide precursor, our findings suggest that this hormonal action is a compensatory mechanism in the regulation of the synthesis of these phospholipids. This partly explains the hormone role as neuroprotector agent.

La Diacilglicerol quinasa (DAGK) es una enzima clave en el control del contenido de los diacilglicéridos (DAGs). Cataliza la formación de ácido fosfatídico (PA) a partir del diacilglicerol (DAG) y adenosina trifosfato (ATP).

El DAG es un intermediario esencial de la síntesis “*de novo*” de los glicerolípidos, producto de la actividad fosfatidato fosfohidrolasa tipo 1 (PAP1) sobre el PA ó de la acción de las fosfolipasas tipo C (PLC) a partir de la hidrólisis del fosfatidilinositol bi-fosfato (PIP<sub>2</sub>) ó de la fosfatidilcolina (PC). A su vez se origina a partir del PA, obtenido por la acción de la fosfolipasa D (PLD) actuante sobre la PC, luego de la acción secuencial de la fosfatidato fosfohidrolasa tipo 2 (PAP2). La generación del DAG como producto de las actividades fosfolipásicas está ligada a los mecanismos de transducción de señal de factores de crecimiento, citoquinas, hormonas, neurotransmisores y otros agonistas (English, 1996; Exton, 1997; Hurley y col., 1997; Nishizuka, 1992).

El DAG, segundo mensajero lipídico, regula una gran variedad de funciones celulares, uniéndose a proteínas “blanco” a través de los dominios C1 (ricos en cisteína), similares a los de la proteína quinasa tipo C (PKC) (Nishizuka, 1992). El DAG promueve la activación de las isoformas de PKC novel y convencional (Newton, 1997), con efectos proliferativos; la activación de Ras mediante las proteínas de la familia RasGRP (Ron y Kazanietz, 1999); recluta proteínas a compartimientos de membrana, incluyendo las quimerinas, proteína quinasa D y proteína Munc 13 (Ron y Kazanietz, 1999), todas conteniendo uno o dos dominios C1. Además, el DAG promueve la activación de canales TRPC (*Transient Receptor Potencial Channels*) (Lucas y col., 2003), aunque éstos carecen de dominio C1. También es un potente activador de los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs), indicando un rol potencial en la regulación de las proteínas G

pequeñas (familias de las Rho y las Ras) (Topham y Prescott, 1999), afectando otras funciones celulares, tales como la reorganización del citoesqueleto, el crecimiento celular y la carcinogénesis (Takai y col., 2001; Topham, 2006). Independientemente a estas funciones regulatorias, el DAG es un intermediario clave para la síntesis de los fosfolípidos zwitteriónicos (PC y PE) (Carman y Zeimet, 1996) y de los triacilglicéridos (TAG).

El DAG puede ser metabolizado de cuatro maneras: 1) hidrólisis de las cadenas de ácidos grasos por la diacilglicerol lipasa (DGL), generando monoacilglicerol (MAG) y ácido graso; 2) adición de CDP-colina o CDP-etanolamina para formar PC o PE, mecanismo que asegura la síntesis “*de novo*” de estos fosfolípidos; 3) acilación mediante aciltransferasas, para generar triacilglicéridos, ó 4) fosforilación del grupo hidroxilo libre para dar ácido fosfatídico (PA), por acción de la DAGK (Fig. 1).

Por otra parte, el PA generado, también es un importante mensajero lipídico y ha sido involucrado en una variedad de respuestas fisiológicas como la polimerización de la actina, la mitogénesis, el tráfico de membranas y la liberación de hormonas (Cockcroft, 1992; Cockcroft y Thomas, 1992; Dillon y col., 1997; Divecha y Irvine, 1995; Exton, 1994a). 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 fosfolipasa C, PLC $\gamma$  (Jones y Carpenter, 1993); la proteína quinasa dependientes de PA, PAK1 (Bokoch y col., 1998); la proteína quinasa C atípica (PKC $\xi$ ) (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 (PP1c $\gamma$ ) (Jones y Hannun, 2002) y la proteína quinasa Raf-1 (Ghosh y col., 1996).

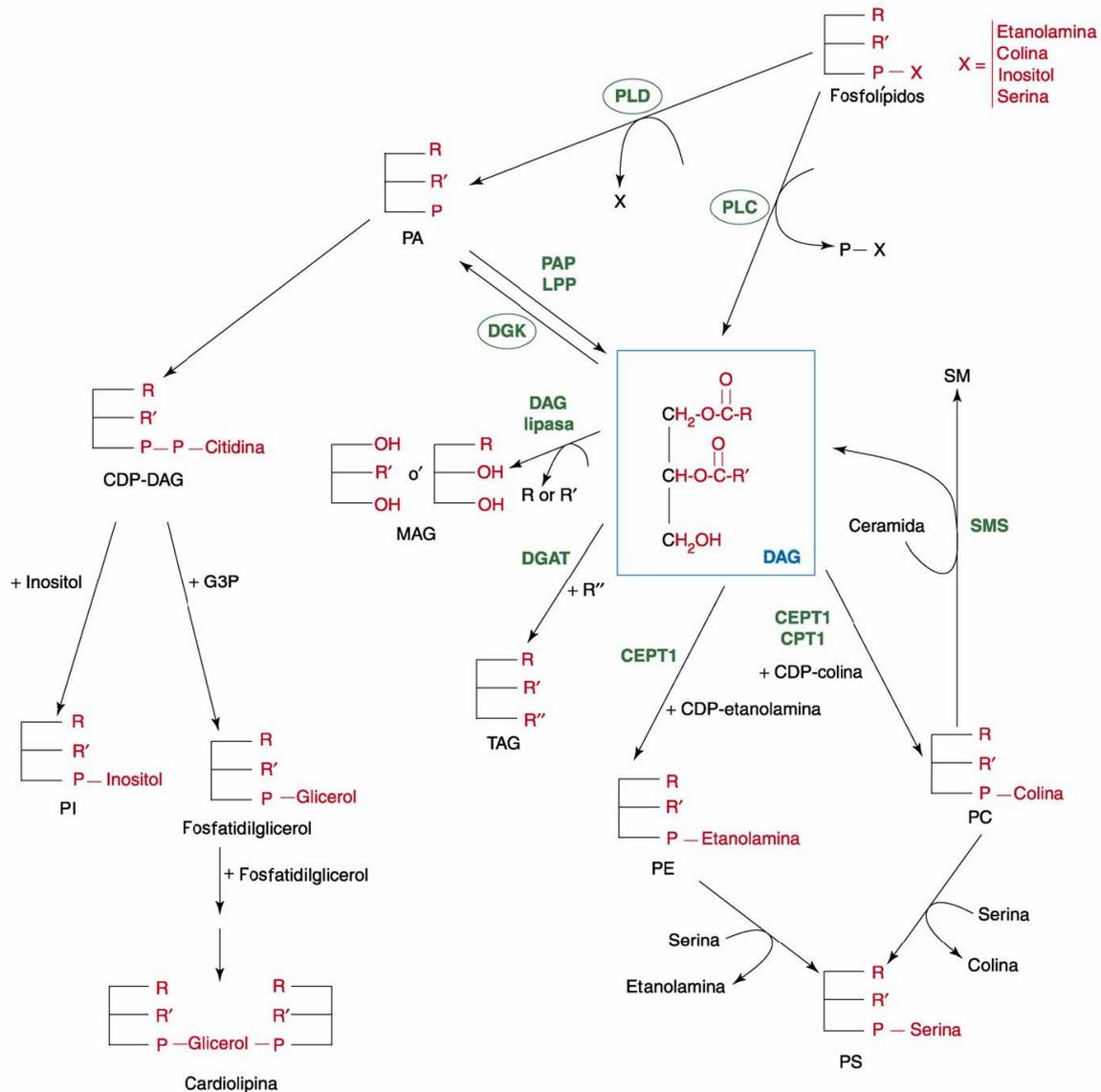


Fig. 1- Esquema representativo del metabolismo del DAG

De esta manera, la DAGK es una enzima clave relacionada íntimamente con eventos de señalización celular mediados por mensajeros lipídicos, ya que regula en forma directa los niveles de DAG y PA.

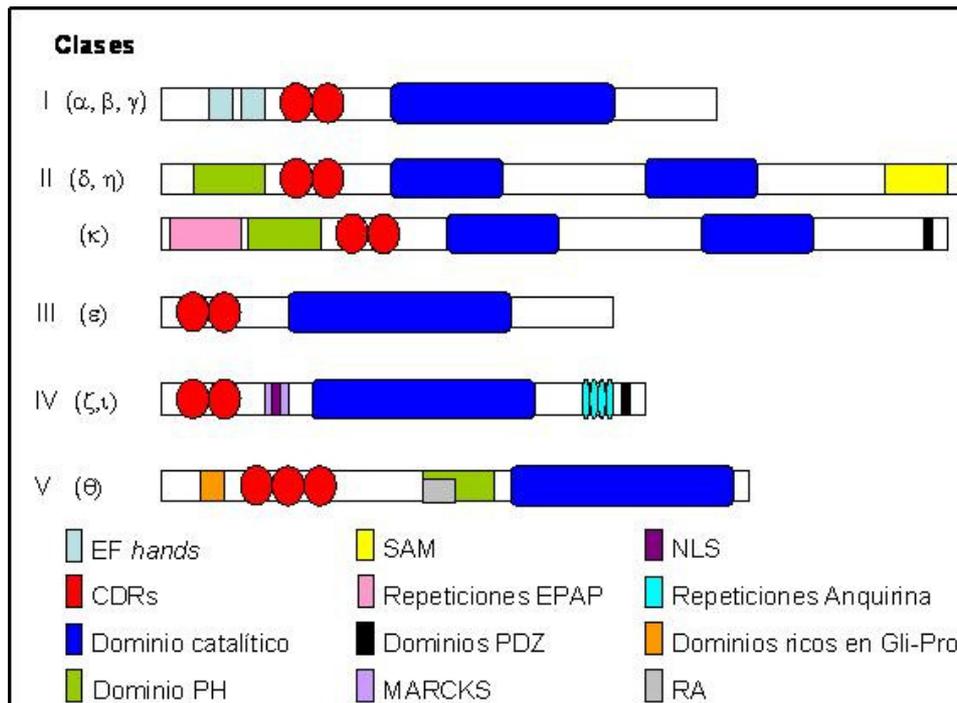
#### **4.1 Isoformas de la DAGK. Estructura y clasificación**

La multifuncionalidad del precursor (DAG) y de su producto (PA) explica la existencia de numerosas isoformas de la DAGK. Hasta la actualidad han sido clonadas diez isoformas:  $\alpha$  (Sakane y col., 1990; Schaap y col., 1990),  $\beta$  (Goto y Kondo, 1993),  $\gamma$  (Kai y col., 1994; Goto y col., 1994),  $\delta$  (Sakane y col., 1996; Goto y col., 1994),  $\epsilon$  (Tang y col., 1996),  $\zeta$  (Goto y Kondo, 1996; Bunting y col., 1996),  $\eta$  (Klauck y col., 1996),  $\theta$  (Houssa y col., 1997),  $\iota$  (Ding y col., 1998b) y  $\kappa$  (Imai y col., 2005). Las distintas isoformas de la DAGK, se basan en las diferencias en su estructura primaria, (Fig. 2), siendo también diferente su distribución tisular (Tabla I). La mayoría de las isoformas se expresan en el cerebro, aunque se distribuyen en forma diferencial en las distintas regiones (Goto y Kondo, 1999b).

El análisis bioquímico de la distribución subcelular de las isoformas de la DAGK, demuestran que algunas son citosólicas, algunas están asociadas a membranas y otras se localizan en el núcleo (Goto y col., 2008). La diversidad molecular y los patrones de expresión diferencial de las isoformas de la DAGK, sugieren una importancia fisiológica de la enzima en las funciones a nivel cerebral (Goto y Kondo, 1999a).

Todas las isoformas de la DAGK de mamífero poseen un dominio catalítico altamente conservado y dos o tres dominios ricos en cisteína (CDRs) similares a los de la PKC (C1A y C1B). Además, poseen otros motivos estructurales, que permiten clasificarlas en cinco clases (Fig. 2).

Las isoformas pertenecientes a la clase I (DAGK  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ), se caracterizan por poseer dominios unidores de calcio ("*EF hands*") que las hacen más activas en presencia de calcio (Yamada y col., 1997). Las pertenecientes a la clase II (DAGK  $\delta$ ,  $\eta$  y  $\kappa$ ), poseen dominios homólogos a pleckstrina (PH).



**Fig. 2 Familia DAGK en mamíferos**

Representación esquemática de las distintas isoformas de la DAGK de mamíferos. Las clases agrupan isoformas que comparten similitudes estructurales.

Los dominios PH de la DAGK $\delta$ , se unen débil y no selectivamente a fosfoinosítidos (Takeuchi y col., 1997). Además, la DAGK $\delta$ , posee en el extremo C-terminal, un dominio SAM (*sterile alpha motif*), que permite localizar a la enzima en el retículo endoplásmico, en donde participa en el tráfico de vesículas hacia el aparato de Golgi (Nagaya y col., 2002). La DAGK $\kappa$ , además, posee repeticiones EPAP (Glu-Pro-Ala-Pro) y un dominio PDZ. Los dominios PDZ intervienen en el reclutamiento e interacción de proteínas, ayudando a formar armazones proteicos y redes de señalización. La DAGK $\epsilon$ , es la única de la clase III, no posee dominios regulatorios identificables, pero es la única isoforma con preferencia por el sustrato, prefiriendo un grupo araquidonoil en posición 2 del DAG (Tang y col., 1996; Walsh y col., 1994). Esta preferencia sugiere que la DAGK $\epsilon$  estaría implicada en la resíntesis de los polifosfoinosítidos que contienen alta

proporción de ácido araquidónico (Rodríguez de Turco y col., 2001; Topham y Prescott, 1999; Topham, 2006). Las isoformas de la clase IV (DAGK  $\zeta$  y  $\iota$ ), tienen una región homóloga a los dominios de fosforilación de proteínas MARKS (*miristoylated alanine-rich C-kinase substrate*), que contiene una señal de localización nuclear (NLS) (Ding y col., 1998b; Topham y col., 1998).

La DAGK $\theta$ , que pertenece a la clase V, contiene tres dominios CDRs, en lugar de dos y un dominio de asociación a Ras (RA). Además, hay variantes de “*splicing*” alternativos, que ocurren en varias isoformas de la DAGK como por ejemplo, en la DAGK $\beta$  (Caricasole y col., 2002), en la DAGK $\gamma$  (Kai y col., 1994), en la DAGK $\delta$  (Sakane y col., 2002), en la DAGK $\zeta$  (Ding y col., 1997), en la DAGK $\iota$  (Ito y col., 2004) y en la DAGK $\eta$  (Murakami y col., 2003).

<b>Clase</b>	<b>Isoforma</b>	<b>Masa Molar</b>	<b>Expresión Tisular</b>
I	$\alpha$	80-86 kDa	Células T, riñón, cerebro
	$\beta$	90 kDa	Cerebro, glándulas adrenals, intestino
	$\gamma$	90 kDa	Retina, cerebro
II	$\delta$	130 kDa	Músculo esquelético, testículo, hígado, leucocitos
	$\eta$	130 kDa	Testículo, pulmón, baso, cerebro, corazón, músculo, riñón, hígado
	$\kappa$	142 kDa	Testículo, placenta
III	$\epsilon$	64 kDa	Testículo, músculo esquelético, páncreas, retina, cerebro
IV	$\zeta$	104 kDa	Timo, intestino, músculo, páncreas, ojos, cerebro
	$\iota$	130 kDa	Cerebro, retina
V	$\theta$	110 kDa	Cerebro, intestino, duodeno, hígado

**Tabla I. Distribución tisular de DAGK en mamíferos**

#### **4.2 La DAGK en el sistema nervioso central (SNC)**

Las distintas isoformas de la DAGK, se expresan abundantemente en el cerebro, sugiriendo un importante rol fisiológico de esta enzima en el

sistema nervioso. La DAGK $\alpha$  se expresa en oligodendrocitos (Goto y Kondo, 1999b), participando en la regeneración de mielina (Chakraborty y col., 2003). La DAGK $\beta$  tiene un patrón de expresión en áreas del cerebro implicadas en la transmisión sináptica de procesos cognitivos y emocionales (Goto y Kondo, 1999a). Se localiza en las neuronas del núcleo caudado, putámen, núcleos *accumbens*, bulbo olfatorio y células piramidales del hipocampo (Goto y Kondo, 1993). La DAGK $\gamma$  se expresa abundantemente en la retina y en el cerebro, principalmente en las células cerebelosas de Purkinje y en forma moderada en el septo, las células piramidales del hipocampo y el bulbo olfatorio (Goto y col., 1994). La expresión de la DAGK $\zeta$  es estrictamente regulada durante el desarrollo (Ding y col., 1998a; Goto y Kondo, 1996). Se expresa principalmente en la corteza cerebelosa, hipocampo, corteza cerebral, y bulbo olfatorio (Goto y Kondo, 1996). La DAGK $\theta$  se expresa en la sustancia gris de la corteza cerebelar y del hipocampo (Houssa y col., 1997). La DAGK $\epsilon$ , única isoforma con especificidad por el sustrato (C20:4-DAG), es muy abundante en retina y cerebro (Kohyama-Koganeya y col., 1997; Rodriguez de Turco y col., 2001), aparentemente asociada a la regulación de señales dependientes de receptores de glutamato metabotrópicos (mGluR). La hibridización in situ, realizada en cortes del cerebro de rata, ha revelado que las señales más elevadas se obtienen en la corteza cerebelar y en el hipocampo (Kohyama-Koganeya y col., 1997). Similares resultados se obtuvieron en cerebro de ratón (Rodriguez de Turco y col., 2001) donde también se halló una sublocalización en las células granulares y de Purkinje de cerebelo, las células piramidales de hipocampo, las células mitrales del bulbo olfatorio y neuronas de la sustancia nigra (Rodriguez de Turco y col., 2001). La DAGK $\iota$  se expresa en el hipocampo, corteza cerebelar, bulbo olfatorio,

tubérculo olfatorio y en forma más moderada, en la corteza cerebral, núcleo caudado, putámen y tálamo (Ito y col., 2004). Recientemente, la DAGK $\eta$  ha sido involucrada en la etiología de desórdenes bipolares (Baum y col., 2008).

### **4.3 La insulina y el receptor de la insulina. Generalidades**

La insulina es la hormona peptídica encargada de regular la concentración plasmática de glucosa y el metabolismo de los carbohidratos para la producción de energía. Es una molécula de 5.734 kDa, constituida por dos cadenas peptídicas.

La insulina ejerce su acción a través del acoplamiento al receptor de insulina (RI), una proteína de membrana heterotetramérica que contiene dos subunidades alfa y dos subunidades beta ( $\alpha_2\beta_2$ ), estabilizada por puentes disulfuro. La insulina se une a dos sitios asimétricos de las subunidades extracelulares alfa y ocasiona cambios conformacionales que dan lugar a la autofosforilación de las subunidades beta que se insertan a través de la membrana, activando la propiedad tirosina-quinasa intrínseca del receptor. Los receptores de la insulina fosforilan en los residuos de tirosina, varios sustratos subyacentes incluyendo los sustratos proteicos del receptor de insulina (IRS). Estos eventos dan lugar a la activación de moléculas de señalización en el interior celular, iniciando así una cascada de señalización.

#### **4.3.1 El rol de la insulina en el sistema nervioso central (SNC)**

En 1978 Havrankova y col., reportaron por primera vez la presencia de la insulina y de su receptor en el SNC (Havrankova y col., 1978). El RI se distribuye extensamente en el cerebro, siendo su concentración mayor en

las neuronas con respecto a las células gliales. Se distribuye diferencialmente en el cerebro presentando mayor densidad de expresión a nivel del bulbo olfatorio, hipotálamo, hipocampo y cerebelo (Kubota y col., 2004; van der Heide y col., 2006; Zhao y col., 1999).

El RI cerebral es desde el punto de vista estructural y funcional, diferente al clásico receptor de insulina del resto de los tejidos. Participa en numerosas funciones que son específicas de la región, a través de mecanismos diferentes de aquellos regulados por el metabolismo de la glucosa. En el hipotálamo, la insulina asociada a su receptor, participa en procesos relacionados con la homeostasis energética del cuerpo, mientras que en la corteza cerebral y en el hipocampo, participa en funciones cognitivas (Zhao y col., 2004).

Estudios anteriores demuestran que la insulina unida al RI puede desempeñar un papel modulador en la transmisión sináptica (Masters y col., 1987; Raizada y col., 1988; Sauter y col., 1983). En el hipocampo, la insulina estimula el “*turnover*” de fosfoinosítidos de la membrana y la producción de diacilglicéridos (Figlewicz y Szot, 1991), dos importantes segundos mensajeros implicados en la activación de PKC.

Se ha reportado, que la desregulación o el deterioro de las vías de señalización mediadas por la insulina y su receptor, podrían estar relacionadas con desórdenes neurodegenerativos, como ocurre en el envejecimiento y en enfermedades tales como la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson (Frolich y col., 1998; Craft y col., 1998; Hoyer, 1998; Gispen y Biessels, 2000; Biessels y col., 2002; Craft y Watson, 2004). Además, se ha reportado que en el envejecimiento, hay una disminución en la expresión del RI (Frolich y col., 1998). Una de las áreas más afectadas

por esta desregulación son aquellas implicadas en los procesos cognitivos (Zhao y col., 2004), como son la corteza cerebral y el hipocampo.

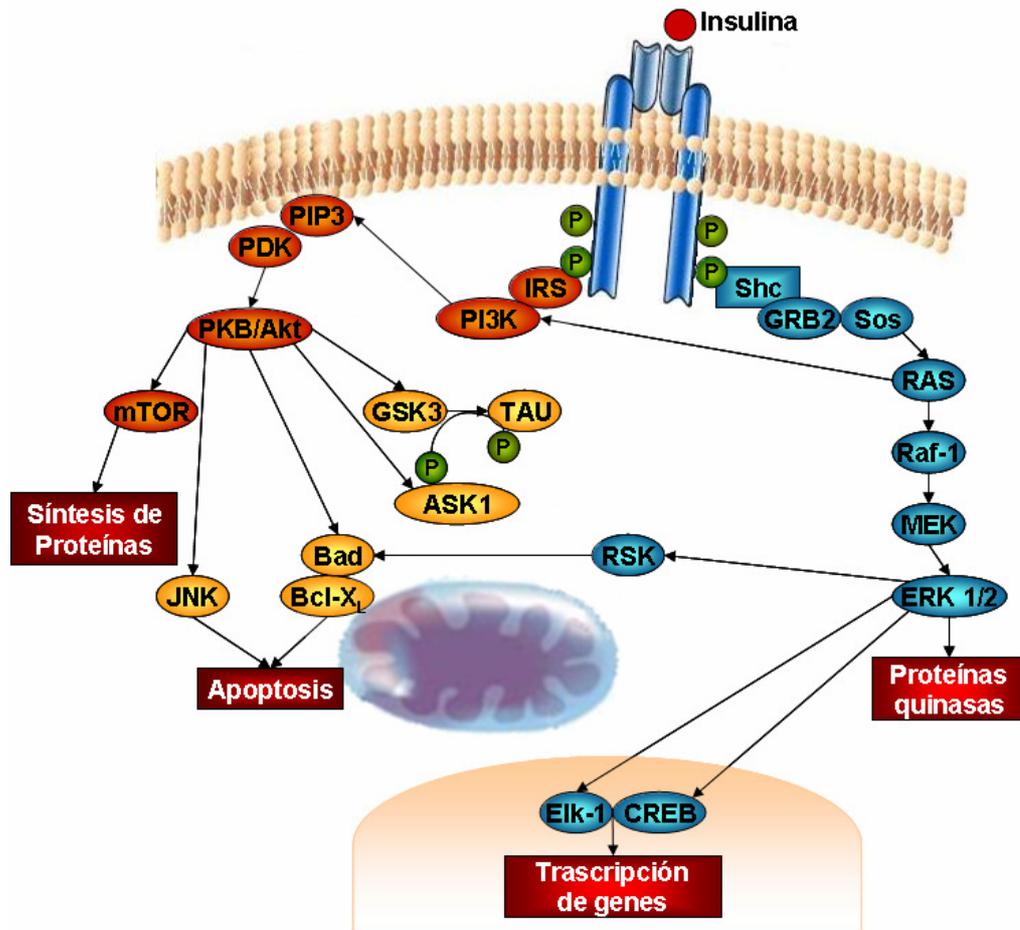
### **4.3.2 Vías de señalización de la insulina**

La insulina realiza una amplia variedad de funciones a través de la unión a su receptor de superficie con actividad tirosina quinasa. Como se mencionó anteriormente, tras la unión de la insulina al RI, se produce una activación de la actividad tirosina quinasa del receptor, provocando la autofosforilación en residuos de tirosina de las subunidades  $\beta$  y la fosforilación de otros sustratos. Se han identificado dos vías principales de señalización de la insulina, la primera es la vía de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK). La Grb2 contiene dominios SH2 que le permiten interactuar con el IRS. Además, por su dominio SH3 une a una región rica en prolina de la Sos, formando un complejo. Sos-Grb2 cataliza el intercambio de GDP (difosfato de guanosina) por GTP (trifosfato de guanosina) sobre Ras, activándolo. Ras-GTP inicia la activación de la Raf (una serina treonina quinasa) que fosforila y activa a la MEK (treonina-tirosina quinasa) que finalmente fosforila y activa a la ERK. La ERK fosforila a otras proteínas en el citosol con blancos nucleares y posee directamente múltiples objetivos nucleares que modulan los procesos de transcripción de los genes Elk-1, SRF, jun/fos (Nelson DL y Cox MM, 2005). Todas estas evidencias son consistentes con los modelos que hablan de la insulina como factor neurotrófico.

La segunda vía de señalización es la ruta de la fosfatidil inositol 3-quinasa (PI3K) que se origina a partir de la unión de los IRSs con el dominio SH2 de la subunidad reguladora, p85 de la PI3K. La PI3K es una enzima heterodimérica compuesta por una subunidad reguladora, p85 y una

subunidad catalítica, p110. La PI3K cataliza la fosforilación de fosfolípidos de inositol en la posición 3 del anillo del inositol, siendo su principal sustrato el fosfatidilinositol 4,5 bi-fosfato (PIP<sub>2</sub>) dando lugar al fosfatidilinositol 3,4,5 tri-fosfato (PIP<sub>3</sub>). Otro mecanismo de regulación de la PI3K es a través de la interacción de Ras con la subunidad catalítica de la PI3K. Por debajo de la PI3K existen quinasas que fosforilan en serina-treonina, denominadas PDK-1 y PDK-2 encargadas de la fosforilación y activación de la PKB, también denominada Akt, la cual una vez fosforilada, se transloca a la membrana plasmática donde es activada por PIP<sub>3</sub>. PKB (Akt) una vez activada puede fosforilar a numerosas proteínas, como la Bad, (evitando que se una a la BCL-XL, iniciando la cascada proapoptótica). La PKB puede también inhibir la ruta de las caspasas (proteínas apoptóticas), promoviendo la expresión de inhibidores de estas proteínas (FLIP) e inactivando a la ASK1 (quinasa reguladora de la señal de la apoptosis-1), proteína que activa las proteínas relacionadas con la apoptosis (Lawlor y Alessi, 2001). Los miembros de la familia de factores de transcripción FoxO, presentes en las neuronas, poseen motivos de unión a la PKB y son un blanco de control del crecimiento y supervivencia neuronal (Jacobs y col., 2003). La quinasa de la glicógeno sintasa 3 (GSK3) fosforila en la neurona proteínas asociadas con los microtúbulos (como las proteínas Tau). La hiperfosforilación de las Tau se asocia con procesos neurodegenerativos y la insulina por la vía PI3K-PKB regula su nivel de fosforilación (Hong y Lee, 1997).

Aunque en tejidos periféricos la fosforilación de IRS-2 y Cbl resultan también en el aumento del tráfico de GLUT4 a la membrana plasmática y con ello el aumento de la captación de glucosa, esto parece no ocurrir en neuronas donde la captación de glucosa depende de GLUT3.



**Fig. 3 Vías de señalización de la insulina**

La insulina une a su receptor activándolo; éste es capaz de reclutar y activar la ruta de la PI3K ó la vía de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK).

IRS: sustrato del receptor de la insulina; PI3K: fosfatidil inositol 3-quinasa; PIP<sub>3</sub>: fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato; PDK: quinasa dependiente de 3-fosfoinosítido; PKB/Akt: proteína quinasa B; mTOR: blanco mamífero de la rapamicina; GSK-3: quinasa de la glicógeno sintasa-3; ASK1: quinasa reguladora de la señal de apoptosis 1; JNK: cjun quinasa N-terminal; GRB2: proteína de unión al factor de crecimiento 2.

En los últimos años se ha valorizado el rol de la insulina en el aprendizaje, memoria y en la neuroprotección. Se ha reportado que el receptor de la insulina cerebral y las Src tirosina quinasas participan en los procesos de transducción de señal durante los procesos de aprendizaje y memoria. Se conoce que modulan la liberación de trasmisores y la conductancia de los receptores de GABA y NMDA. Durante el proceso de aprendizaje se produce

un aumento en la expresión de genes. Dos de ellos son el receptor de la insulina y c-Src. Por otro lado los receptores de la insulina han sido localizados en las sinapsis neuronales y a través de *knock out* condicionales se ha logrado determinar su implicancia en los procesos de aprendizaje y de memoria (Fox y col., 2003; Lupien y col., 2003).

La deficiencia de la insulina en individuos con Diabetes Mellitus (DM), ha sido asociada con pérdida de la memoria y trastornos neurodegenerativos tales como la enfermedad de Alzheimer (EA) (Castano y Frangione, 1995; Lopez y col., 2000; Zhao y col., 2004; Zhao y col., 2008). La fuerte correlación hallada entre la DM y la EA ha llevado a sugerir que la misma es una diabetes tipo III, asociada a la pérdida de la insulina en el SNC (Rivera y col., 2005; Steen y col., 2005). De hecho se ha observado que en la encefalopatía diabética se presentan las características de un envejecimiento acelerado con alteraciones en la producción de segundos mensajeros y la actividad de proteína quinasas (Biessels y col., 2002). También se ha sugerido que la cascada de señalización de la insulina en el cerebro sería de vital importancia en el metabolismo normal de las proteínas precursoras del beta amiloide y tau (Hoyer, 2002).

### **4.3.3 Acción de la insulina en la actividad de enzimas ligadas a la generación de mensajeros lipídicos en cerebro**

Los fosfolípidos son los principales componentes estructurales de las membranas biológicas y tienen una importante participación en las respuestas celulares (Exton, 1994b; Nishizuka, 1995). La hidrólisis de algunos importantes fosfolípidos lleva a la generación del DAG, sustrato para la DAGK. Así, la hidrólisis del PIP<sub>2</sub> por acción de la PLC específica de fosfoinosítidos (PI-PLC), produce inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) y DAG de

composición principalmente insaturada (Cockcroft y Thomas, 1992). La hidrólisis de la PC por una fosfolipasa específica, la PC-PLC, también genera DAG. La PC también es un sustrato de la PLD, que genera colina y PA.

En estudios previos realizados en este laboratorio se ha demostrado que en los terminales sinápticos de CC la exposición a la insulina aumenta la actividad de la fosfolipasa tipo D, que genera PA a partir de PC, sin producir modificaciones en la actividad de PAP tipo 2. Además se ha encontrado que la insulina incrementa la actividad DAGK utilizando como precursor DAG radiactivo. Sin embargo, se ha observado que en los sinaptosomas de CC de ratas seniles, las actividades de estas enzimas y su respuesta a la insulina se hallan sensiblemente modificadas (Salvador y col., 2005). Esto indica que la hormona regula la formación de DAG y PA y que esta acción está alterada en el envejecimiento.

En la presente tesis se describen los estudios realizados para determinar la participación de la DAGK en la vía de señalización de la insulina en el SNC. Sobre la base de lo previamente expuesto, el principal objetivo es determinar la acción de esta hormona en terminales sinápticos de CC y de hipocampo, como también evaluar los cambios producidos en el envejecimiento.

Los resultados se describen en tres capítulos. Los objetivos particulares de cada capítulo son:

**Capítulo I:** Determinar las características de la actividad de la DAGK, evaluando la cinética a partir de distintas fuentes de sustrato.

**Capítulo II:** Responder a los siguientes interrogantes respecto a la acción de la insulina:

- 1) ¿Es la activación de DAGK consecuencia del incremento de diacilglicerol?
- 2) ¿Qué vía fosfolipásica, generadora de DAG, está implicada en la eventual aparición de DAG?
- 3) ¿Existe un efecto “genuino” sobre la DAGK, para promover una mayor formación de PA?
- 4) ¿Qué posibles mecanismos regulatorios participan en la modulación del efecto de insulina sobre DAGK?

**Capítulo III:** Evaluar el rol de la insulina en la activación de la DAGK en un modelo animal de envejecimiento normal y en áreas relacionadas con el aprendizaje y la memoria, como son la CC y el hipocampo.

### 6.1 Materiales

Los reactivos para las soluciones tampón utilizadas para el aislamiento y la purificación de las fracciones subcelulares y aquellos empleados en los diferentes ensayos (Hepes, EDTA,  $\text{CaCl}_2$ , NaCl, ficoll, sacarosa), los inhibidores de proteasas (PMSF, aprotinina, leupeptina, pepstatina) y los lípidos se adquirieron en Sigma Aldrich Co. Los solventes empleados para la cromatografía en capa fina fueron de los laboratorios Merck y Dorwill S. A. y los de grado HPLC de J.T.Baker y U.V.E. La sílica gel G y H para la cromatografía en capa fina así como las placas de capa fina de alta *performance*, fueron adquiridos a Merck Laboratories. El trifluoruro de boro 14% en metanol para la obtención de metil ésteres de ácidos grasos y el revelador 2',7'-diclorofluoresceína empleado para la visualización de los lípidos en las placas cromatográficas se adquirieron en Sigma Aldrich. Otros reactivos y solventes fueron de Merck, Mallinckrodt y Riedel de Haën. La fuente enzimática empleada para obtener diacilglicéridos a partir de triacilglicéridos fue de Calbiochem. El ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  (3.000 Ci/mmol), el glicerol- $[\text{}^3\text{H}]$  (16 Ci/mmol) y el Omnifluor para la cuantificación de la radioactividad, fueron adquiridos por New England Nuclear-Dupont (Boston, MA). El 1,2-dipalmitoilglicerol, el 1,2-dioleoilglicerol y el 1-estearoil, 2-araquidonoilglicerol utilizado como sustratos fueron de Sigma Aldrich Co. Los anticuerpos anti-DAGK utilizados fueron provistos gentilmente por el Dr. Matthew Topham, de la Universidad de Utah. El anticuerpo secundario anti-*rabbit* unido a FITC y anti-*rabbit* unido a *Horse radish peroxidase* fueron obtenidos en Jackson Inmuno Research Laboratories).

### 6.2 Material Biológico

Para éste trabajo de tesis se utilizó como material biológico terminales sinápticos (sinaptosomas) obtenidos de la corteza cerebral (CC) y el hipocampo (Hip) de ratas adultas de 4 meses y seniles de 24-28 meses y fracciones subcelulares de la CC de ratas adultas. Los animales, de la cepa Wistar, fueron mantenidos bajo condiciones ambientales constantes de temperatura y ciclos de luz-oscuridad y criados con una dieta estándar.

Los terminales sinápticos de CC e Hip, fueron obtenidos por fraccionamiento subcelular a partir del homogenado total de cada una de estas áreas cerebrales, siguiendo el procedimiento que se detalla a continuación (apartado 6.2.1, 6.2.2 y 6.2.3).

Para la obtención de DAG-[<sup>3</sup>H] y TAG-[<sup>3</sup>H], biosintetizados a partir de glicerol-[<sup>3</sup>H], se utilizaron retinas bovinas enteras.

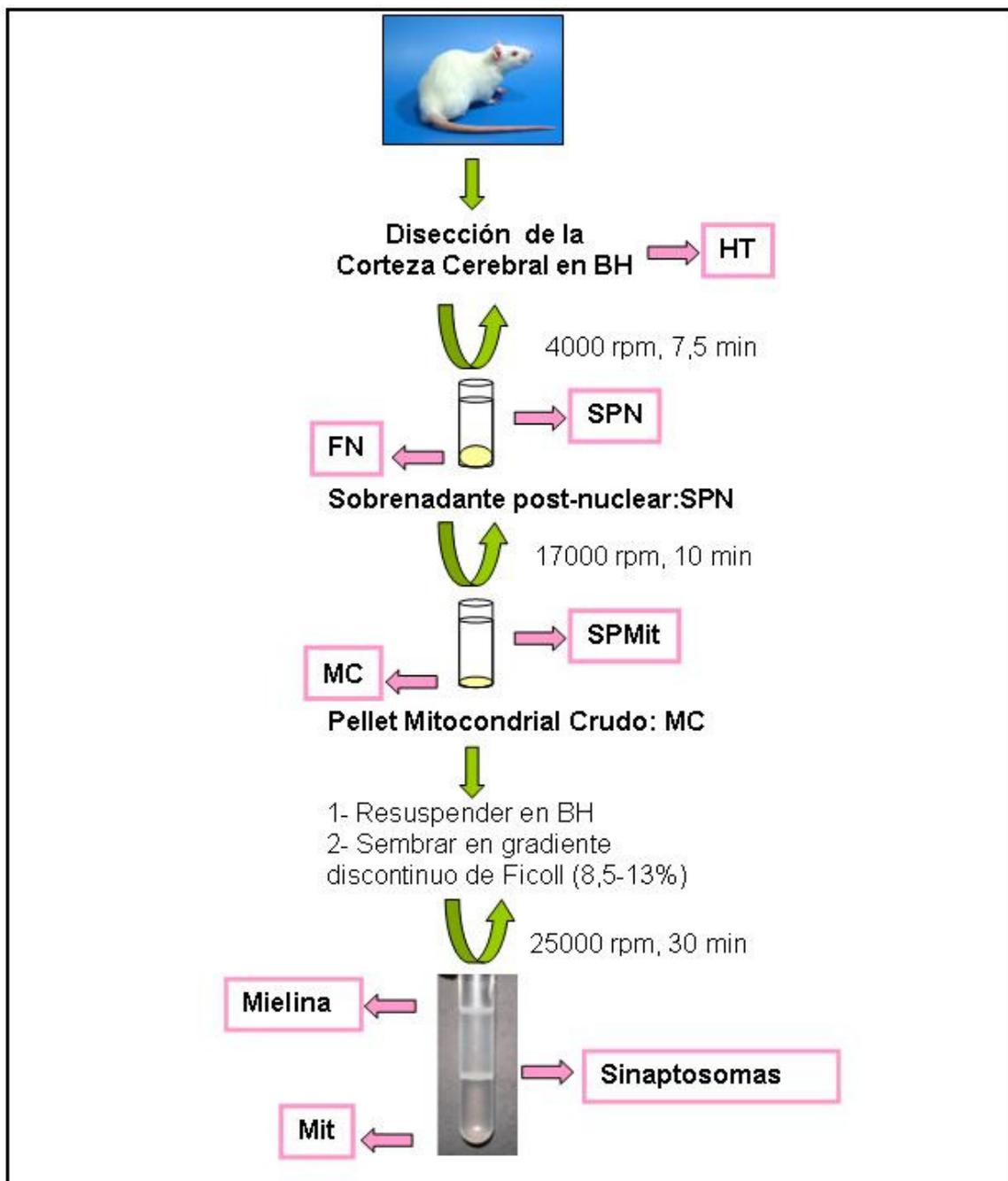
### **6.2.1 Obtención de homogenado total de corteza cerebral**

Las ratas fueron decapitadas y la corteza cerebral fue inmediatamente disecada y homogeneizada en un *buffer* de homogeneización (BH) al 20 % p/v, conteniendo 0.32 M de sacarosa, 1 mM de EDTA, 10 mM de *buffer* HEPES a pH 7.4, en presencia de 1 mM de DTT, 2 µg/ml de leupeptina, 1 µg/ml de pepstatina, 1 µg/ml de aprotinina y 0.1 mM PMSF. Se utilizó un homogenizador Potter-Elvehjem, con una luz de 0,125 mm, con vástago de teflón, a 700 rpm. Luego el homogenado total (HT) se diluyó al 10% con el mismo BH.

### **6.2.2 Obtención y purificación de sinaptosomas de corteza cerebral y otras fracciones subcelulares**

La fracción sinaptosomal fue obtenida por centrifugación diferencial (Cotman, 1974) a partir del homogenado total de corteza cerebral. El

homogenado total diluido al 10% con el BH se centrifugó a 9.600 g por 7,5 minutos utilizando un rotor JA-21 y una centrífuga marca Beckman J2-21. El sobrenadante (sobrenadante post-nuclear: SPN) se separó cuidadosamente sin remover el pellet (fracción nuclear: FN) y se transfirió a un tubo limpio, el cual fue sometido a una nueva centrifugación a 26.400 g por 20 minutos (11.000 rpm) obteniendo así el pellet mitocondrial crudo (MC). El sobrenadante post-mitocondrial (SPMit), contiene la fracción microsomal. Para la purificación de los sinaptosomas (Sinap.), la fracción MC se lavó una vez y luego se resuspendió en 3 ml de BH y se sembró en un gradiente discontinuo de Ficoll conteniendo 6 ml de Ficoll al 8,5 % y 6 ml de Ficoll al 13 % en BH. Las muestras así cargadas en el gradiente discontinuo, se centrifugaron a 134.000 g por 30 minutos (25.000 rpm) utilizando un rotor SW 28.1 y una ultracentrífuga (Beckman L5-50). La banda de mielina se ubica en la interfase entre el BH y el medio de Ficoll al 8,5 %, la banda sinaptosomal se encuentra en la interfase de Ficoll al 8,5 % y 13 %, mientras que la fracción mitocondrial (FMit) forma el pellet debajo del Ficoll al 13 %. La fracción sinaptosomal se lavó con BH, centrifugando a 40.800 g por 20 minutos (17.000 rpm) en un rotor JA-21. El pellet así obtenido se resuspendió en el *buffer* utilizado para el ensayo enzimático, inmediatamente antes de ser utilizado. Todos los procedimientos, incluidos la homogenización y las centrifugaciones, se realizaron a temperaturas entre 0-4 °C. La Fig. 4, describe el protocolo de obtención de las fracciones subcelulares detalladas anteriormente. Este protocolo fue utilizado en forma rutinaria en todos los estudios presentados en esta tesis.

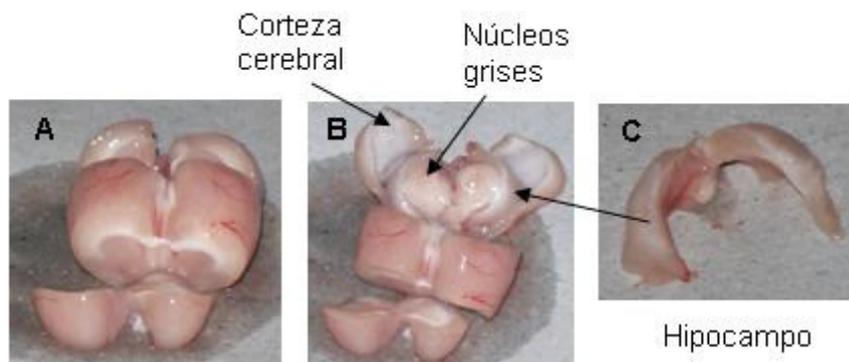


**Fig. 4 Protocolo para la obtención de las fracciones subcelulares de la corteza cerebral de ratas**

HT: homogenado total; SPN: sobrenadante post-nuclear; FN: fracción nuclear; SPMit: sobrenadante post-mitocondrial; MC: pellet mitocondrial crudo; Sinaptomas; Mit: pellet mitocondrial

### **6.2.3 Obtención y purificación de los sinaptosomas de Hipocampo**

Para la obtención de los sinaptosomas de hipocampo, las ratas utilizadas fueron decapitadas y el cerebro inmediatamente disecado para la obtención del hipocampo. El cerebro se lavó con solución fisiológica para remover la sangre en superficie y se colocó sobre una caja de Petri que se mantuvo sobre hielo. Luego de separar cerebelo y tronco, los hemisferios fueron seccionados en tres partes (Fig. 5A) y la corteza cerebral fue removida para exponer la región hipocampal (Fig. 5B). El hipocampo fue cuidadosa e inmediatamente removido (Fig. 5C). El procedimiento se realizó sobre una placa de vidrio apoyada en hielo para mantener la temperatura en aproximadamente 1-2 °C.



**Fig. 5- Cortes efectuados en cerebro de rata para la obtención del Hipocampo**

Las ratas fueron decapitadas y el cerebro inmediatamente disecado para la obtención de las regiones de interés.

A: cortes transversales del cerebro; B: separación de la corteza cerebral para exponer la zona hipocampal; C: hipocampo

El hipocampo se removió con ayuda de agujas y lupa, separando la corteza cerebral (exterior) y los núcleos grises (parte interior del corte). En la Fig. 5C se presenta la estructura hipocampal obtenida. Desde la decapitación hasta la obtención de esta estructura transcurrieron como máximo 4 min. Posteriormente se procedió a la homogeneización y purificación de los

sinaptosomas en gradiente de Ficoll, como se describió anteriormente para los sinaptosomas de corteza cerebral (apartado 6.2.1 y 6.2.2)..

### **6.3 Sustrato enzimático**

Para el ensayo enzimático se utilizaron sustratos lipídicos con diferentes características:

- 1) Se utilizaron diaciglicéridos marcados con tritio en la cadena de glicerol, obtenidos mediante su biosíntesis por incubación de las retinas bovinas con glicerol- $^3\text{H}$ .
- 2) Se utilizaron diaciglicéridos marcados con tritio en la cadena de glicerol, obtenidos por hidrólisis de triacilglicéridos- $^3\text{H}$  (TAG- $^3\text{H}$ ) provenientes de su biosíntesis por incubación de las retinas bovinas con glicerol- $^3\text{H}$ .
- 3) Se utilizaron diaciglicéridos de diferente composición en ácidos grasos (1,2-dipalmitoilglicerol, 1,2-dioleoilglicerol y 1-estearoil, 2-araquidonoilglicerol).

#### **6.3.1 Obtención de DAG- $^3\text{H}$ de retina bovina**

Para la obtención del DAG- $^3\text{H}$  las retinas bovinas fueron incubadas con glicerol- $^3\text{H}$ , en un medio adecuado a 37°C y los lípidos marcados, fueron extraídos con mezclas de solventes y luego purificados por TLC.

##### **6.3.1.1 Incubación de las retinas**

Las retinas fueron incubadas en un baño termostatzado a 37°C con agitación continua, en un erlenmeyer de 250 ml, provistos de tapón de goma con dos agujas, para la entrada y salida de gas carbógeno: oxígeno-anhídrido carbónico (95:5 v/v). La aguja de entrada fue de mayor calibre que la

de salida, para poder mantener sobre la superficie del líquido una presión conveniente. El gas se hizo burbujear primeramente, en una trampa de agua destilada para mantener la humedad del mismo durante la incubación.

### **6.3.1.2 Medio de incubación**

El medio de incubación utilizado fue una solución iónica de pH 7,33, descrita por Ames-Hastings (AMES, III y HASTINGS, 1956). La composición y concentración de electrolitos del mismo fue similar a la del líquido cefalorraquídeo, conteniendo 119,5 mM de NaCl; 3,6 mM de KCl; 0,1 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 0,4 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 1,2 mM de  $\text{MgSO}_4$ ; 1,15 mM de  $\text{CaCl}_2$ ; 22.6 mM de  $\text{NaHCO}_3$  y al cual se le agregó 2 mg/ml de glucosa y se lo gaseó con carbógeno durante 15 min para conseguir un pH de 7,33.

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  $\mu\text{Ci}$ /retina de glicerol- $^3\text{H}$  con una actividad específica de 16 Ci/mmol.

### **6.3.1.3 Disección de la retina**

Para la obtención de las retinas se utilizaron ojos bovinos de animales sacrificados en un frigorífico local. Los ojos fueron enucleados inmediatamente después de la muerte del animal y colocados en un recipiente con hielo para su transporte al laboratorio. Aproximadamente transcurridas 2 horas de su enucleación, el ojo bovino se seccionó primeramente con bisturí en un corte sagital (plano antero posterior del globo ocular) de aproximadamente 1 cm. Luego se dividió cortando con tijera en una línea paralela al plano antedicho. La mitad que contiene las lentes y el humor vítreo (parte anterior del ojo) se descartó y 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 separada se cortó el nervio óptico para extraerla. Las retinas así obtenidas, fueron incubadas en el medio iónico anteriormente descrito y en presencia de 10  $\mu\text{Ci}$ /retina de glicerol- $^3\text{H}$  (16 Ci/mmol).

### **6.3.1.4 Extracción de lípidos neutros**

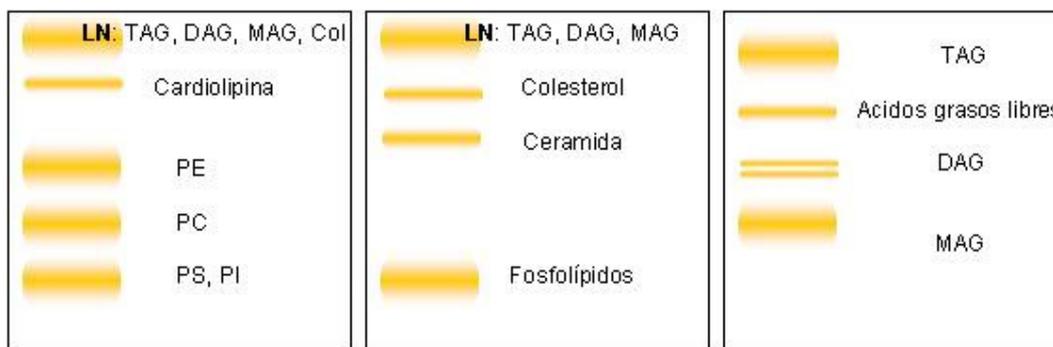
Los lípidos fueron extraídos del tejido con una mezcla de cloroformo y metanol (C:M, 2:1, v/v) según Folch y col. (FOLCH y col., 1957), utilizando un homogenizador Potter-Elvehjem, a 700 rpm con vástago de teflón. La suspensión del solvente orgánico que contiene las proteínas desnaturalizadas y los lípidos en solución fue filtrada. El extracto (crudo) fue transferido a un erlenmeyer con tapón de vidrio esmerilado, se gaseó con nitrógeno y se guardó en heladera por 24 hs. Posteriormente, para “purificar” el extracto y extraer así las moléculas no lipídicas disueltas en el solvente orgánico, se realizó una partición con una solución acuosa conteniendo 0,88 % de KCl y 0,1% de glicerol 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 clorofórmica. Antes de desechar a la fase superior (acuosa-metanólica) se “marcó” sobre el erlenmeyer el volumen del medio. Luego de descartar la fase superior con pipeta Pasteur, la fase orgánica se mezcló con un volumen de fase superior teórica (FST) cloroformo/metanol/KCl/glicerol (3:48:47, v/v) equivalente al que se descartó. Este procedimiento se repite 2 a 4 veces. Los lípidos así obtenidos que permanecen en la capa clorofórmica, se

concentraron bajo nitrógeno y el extracto lipídico “purificado” y gaseado con  $N_2$  se mantuvo a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para el posterior aislamiento de sus componentes.

#### **6.3.1.5 Separación de los lípidos por cromatografía en capa fina (TLC)**

Se utilizó cromatografía en capa fina, utilizando como soporte placas de vidrio (20x20 cm) preparadas mediante un extensor de placas marca Shandon, con una suspensión de sílica gel G ó H, dependiendo de los lípidos a separar y con un espesor de 600  $\mu\text{m}$ . Las placas fueron activadas previamente a su uso, por calentamiento a  $110\text{ }^{\circ}\text{C}$  en estufa de secado durante 1 h. La siembra del extracto resuspendido en cloroformo, se realizó luego del enfriado de la placa, bajo atmósfera de  $N_2$ , para preservar la composición de los lípidos del extracto. Las placas se desarrollaron en sistemas monodimensionales para la separación de fosfolípidos de los lípidos neutros. Para tal fin se utilizaron como sistema de solventes, Cloroformo: Metanol:  $H_2O$  (C:M: $H_2O$ , 65:25:4, v/v) en sílica gel H preparada en una solución de acetato de Mg al 0,3% (Fig. 6a) ó Cloroformo:Metanol: $H_2O$ : $NH_3$  (C: M:  $H_2O$ :  $NH_3$ , 90:10:0,5:0,5, v/v) con sílica gel G (Fig. 6b). Los lípidos neutros fueron luego 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:Acido Acético (H:E:Ac Ac, 70:30:2,3, v/v) (Fig. 6c). El sistema de Cloroformo: Metanol:  $H_2O$ :  $NH_3$  (C:M: $H_2O$ : $NH_3$ , 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 los lípidos neutros de los fosfolípidos, también resolvía la separación entre los lípidos neutros y el colesterol, de manera que posteriormente no interfiriera en la purificación de los diacilglicéridos (DAG), ya que 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.



**Fig. 6- Cromatografía en capa fina para el aislamiento de lípidos**

(a) C:M:H<sub>2</sub>O (65:25:4), en sílica gel H en acetato de Mg al 0,3%

(b) C:M:H<sub>2</sub>O:NH<sub>3</sub> (90:10:0,5:0,5), sílica gel G en agua

(c) H:E:AcAc (70:30:2,3), sílica gel G en agua

### 6.3.1.6 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 (I<sub>2</sub>). Dado que I<sub>2</sub> se fija a las dobles ligaduras de ácidos grasos, componentes de los glicerolípidos, la aparición de manchas marrones o amarillas indica la presencia de los mismos. Esta diferencia en la coloración depende de la cantidad de lípido y la insaturación de la especie adsorbida. En los casos de muestras destinadas a ser utilizadas como sustrato o muestras que deben ser extraídas de la placa cromatográfica para una posterior corrida en otro sistema de solventes, este procedimiento está contraindicado debido a la ruptura del doble enlace. Por esta razón en estos casos las placas se rociaron con 2',7'-diclorofluoresceína al 0,05 % en metanol. Los lípidos se visualizaron bajo luz ultravioleta. Estos procedimientos se realizaron bajo atmósfera de N<sub>2</sub> para minimizar la peroxidación de los ácidos grasos insaturados.

### **6.3.2 Obtención de DAG-[<sup>3</sup>H] a partir de la hidrólisis de Triacilglicéridos-[<sup>3</sup>H] (TAG-[<sup>3</sup>H]) de retina bovina**

La incubación de las retinas bovinas con glicerol-[<sup>3</sup>H] también genera TAG-[<sup>3</sup>H] de elevada actividad específica (Giusto y Bazan, 1979). Esto permitió utilizarlo como fuente de DAG-[<sup>3</sup>H] mediante un procedimiento de hidrólisis enzimática utilizando lipasa pancreática de cerdo. La lipasa pancreática cataliza la hidrólisis del TAG de manera secuencial (Lykidis y col., 1994), generando en primer lugar DAG, el cual es sustrato para una segunda reacción catalizada por la misma enzima, dando lugar a la formación de MAG, que posteriormente se hidroliza para dar glicerol, liberando en cada reacción ácido graso libre (AGL). Estas reacciones lipolíticas secuenciales ocurren simultáneamente y con diferentes parámetros cinéticos, siendo más rápida la hidrólisis del DAG que la hidrólisis del TAG (Lykidis y col., 1995). De ésta manera y luego de numerosas pruebas, en donde se modificaron varios parámetros de reacción, como ser, el tiempo de reacción, el pH, la temperatura, la concentración enzimática o el tipo de agente detergente usado para formar la micela que contiene el TAG, se logró obtener DAG-[<sup>3</sup>H] a partir de TAG-[<sup>3</sup>H] con una eficiencia de aproximadamente un 10-20 %, utilizando un *buffer* fosfato 20 mM, 400 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 3 mM de Deoxicolato de sodio, 0,25 mg/ml de lipasa pancreática de cerdo y 2 nmol/ml de TAG-[<sup>3</sup>H] a pH 8 y 20 °C, durante 10 min. La reacción se frena por el agregado de C:M (2:1). Los lípidos fueron extraídos según Folch (FOLCH y col., 1957) agregando 0,2 vol de agua y agitando vigorosamente en vortex. Posteriormente se procedió a la separación de los lípidos neutros por TLC utilizando el sistema detallado en la Fig. 6c. El DAG-[<sup>3</sup>H] así obtenido fue identificado con estándares adecuados y eluidos de la placa según la técnica de Ardivinson.

#### **6.4 Análisis de la composición de ácidos grasos del DAG-[<sup>3</sup>H]**

Para el análisis de los ácidos grasos esterificados al DAG, éste se separó por TLC y se visualizó con 2',7'-diclorofluoresceína, como se describió previamente. La mancha correspondiente al DAG se raspó de la sílica y se transfirió a tubos con tapa a rosca, con cubierta interna de Teflón, donde se prepararon los metil ésteres de ácidos grasos (FAME) por metanólisis para el posterior análisis por cromatografía gaseosa.

##### **6.4.1 Preparación de metil ésteres de ácidos grasos (FAME)**

La obtención de los FAME se realizó por metanólisis bajo N<sub>2</sub>, catalizada por trifluoruro de boro al 14 % en metanol a 45° C durante toda la noche (MORRISON y SMITH, 1964). Se realizaron los controles correspondientes, para permitir evaluar la recuperación y cuantificación de los ácidos grasos derivatizados. Los metil ésteres en solución metanólica, se extrajeron mediante partición con hexano y agua en igual proporción que la solución de metanol. Luego de la partición, la fase inferior se secó bajo corriente de nitrógeno. Los metil ésteres se purificaron por TLC sobre placas de sílica gel G previamente lavadas con metanol: éter (M:E, 75:25, v/v). Para la purificación de los FAME, se utilizó hexano: éter (H:E, 95:5, v/v) como solvente. Las manchas de metil ésteres (R<sub>f</sub> aprox. 0.5) se visualizaron bajo luz ultravioleta luego de rociar con 2',7'-diclorofluoresceína. Los FAME fueron eluidos de la sílica por partición entre agua, metanol y hexano (1:1:1, v/v). Se realizaron en total 3 extracciones con hexano, agitando y centrifugando cada vez.

##### **6.4.2 Análisis de los FAME por cromatografía en fase gaseosa (CG)**

Los FAME son los derivados más comúnmente utilizados para estudiar y cuantificar a los ácidos grasos ya que pueden ser separados por cromatografía de reparto gas-líquido en función de la longitud de su cadena y de su grado de insaturación. Para analizarlos, se utilizó un cromatógrafo Varian 3700 provisto de 2 columnas de vidrio (2 m de longitud x 2 mm de diámetro) empaquetadas con una fase estacionaria polar, 10% SP2330 (Supelco), empleando nitrógeno como gas portador (30 ml/ min). El cromatógrafo está equipado con dos detectores de ionización de llama utilizando un electrómetro diferencial de dos canales. Las temperaturas del inyector y del detector fueron 220°C y 230°C respectivamente. Las separaciones se realizaron sometiendo el horno de las columnas a gradientes de temperatura, en la mayor parte de los casos con incrementos lineales de 5°C por minuto desde una temperatura inicial de 155°C a una temperatura final de 230°C, la cual se mantuvo constante durante el tiempo necesario para permitir la elusión completa (aprox. 20 minutos).

Los metil ésteres se identificaron sobre la base de sus tiempos de retención utilizando Estándares comerciales. La cuantificación se realizó utilizando un detector por ionización de llama, empleando integración electrónica (Varian Workstation).

### **6.5 Ensayo enzimático para la actividad diacilglicerol quinasa (DAGK)**

El ensayo enzimático se realizó a una temperatura constante de 37°C, en baño termostatzado con agitación continua. El tiempo de incubación fue de 5 min, a partir del agregado de la membrana sinaptosomal, en un volumen final de 200 µl. En los casos en donde se utilizaron inhibidores, se realizó una preincubación de 10 min con la membrana sinaptosomal y posteriormente se agregó el sustrato radiactivo, comenzando con la

incubación de 5 min. En los ensayos en donde se utilizó como sustrato radiactivo el ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ , previa incubación se realizó un sonicado de 15 segundos en baño sonicador, a fin de introducir el ATP al sinaptosoma. El *buffer* utilizado en el ensayo enzimático para la DAGK (BE), contenía 10 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 20 mM de NaF y 10 mM HEPES a un pH de 7.4. En los casos en donde se utilizó sustrato lipídico (DAG) exógeno, el mismo fue suspendido en el *buffer* conteniendo algún agente detergente para obtener micelas de lípido-detergente, que dependiendo de los objetivos del ensayo, fueron:  $\beta$ -octilglucósido (50 mM), Tritón X 100 (15 mM), deoxicolato de sodio (1 mM) ó dimetilsulfóxido (0.1%). Este procedimiento se explicita en 6.5.2.

En los ensayos en donde se estudió la mediación de PKC sobre la actividad DAGK, se utilizó un *buffer* de fosforilación (HBM), que contenía 120 mM NaCl, 5 mM de KCl, 20 mM de Hepes, 5 mM de  $\text{NaHCO}_3$ , 1 mM de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$ , 1,2 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 10 mM de glucosa a pH 7,4.

En todos los casos, luego de la incubación, el ensayo se frenó por el agregado de 3 ml de cloroformo: metanol (C:M, 1:1, v/v).

### **6.5.1 Extracción de lípidos y aislamiento del producto enzimático**

Para la extracción de los lípidos del tejido, se procedió según Folch (FOLCH y col., 1957) con algunas modificaciones que permiten favorecer la extracción de los lípidos acídicos (Giusto y Ilincheta de Boschero, 1986). En los tubos del ensayo conteniendo la suspensión sinaptosomal ensayada en 3 ml de cloroformo: metanol (C:M, 1:1, v/v), procedimiento que frena la actividad enzimática por desnaturalización de proteínas, se agregó 1 ml de cloroformo: metanol: HCl conc (C:M:Ac, 1:1:0,06 v/v) y se completó con 2 ml de cloroformo de tal forma de tener una relación de cloroformo: metanol de (C:M, 2:1, v/v). La mezcla acídica luego de agitarla, se dejó por 1 hora a

temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 0,2 vol 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. Se centrifugó y la fase superior (acuosa) se descartó. La fase inferior clorofórmica se lavó con igual volumen que aquel extraído, con fase superior teórica (FST), conteniendo cloroformo: metanol: agua (C:M:H<sub>2</sub>O, 3:48:47, v/v). En los casos en donde se trabajó con ATP-[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P], se realizaron 4 lavados con fase superior teórica (FST) a fin de eliminar el radiactivo que queda sin reaccionar. La fase inferior clorofórmica, se secó bajo corriente de nitrógeno. Este procedimiento permite la eliminación del solvente orgánico acidificado (HCl) 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 porción de solvente C:M (2:1, v/v) y se sembró en placas de sílica para TLC, previamente activadas a 100 °C por 1 hora.

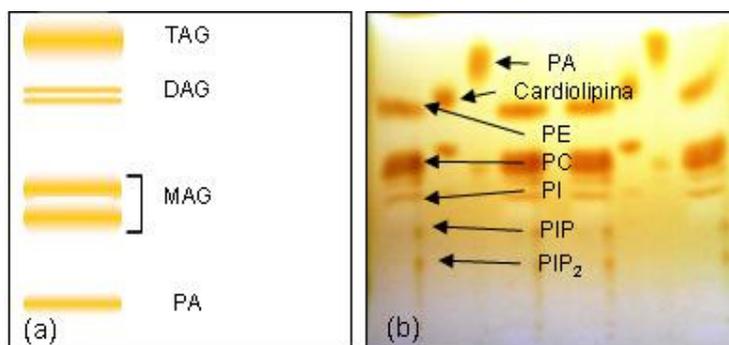
Para separar PA-[<sup>3</sup>H], se utilizaron placas de sílica gel G, en un sistema compuesto de hexano: eter: Ac. Acético (30:70:2,3 v/v) Fig. 7a. El PA-[<sup>3</sup>H] queda junto a otros fosfolípidos no radiactivos (que no interfieren), en el origen. Los lípidos se visualizaron por exposición de la placa a vapores de I<sub>2</sub> (manchas amarillas a marrones) y se identificaron adecuadamente usando los correspondientes estándares de lípidos. Se rasparon las manchas de PA-[<sup>3</sup>H] (en el origen) y al DAG-[<sup>3</sup>H] remanente (a 3 cm del frente del solvente) y se colocaron en viales para la cuantificación de la radioactividad.

Para separar PA-[<sup>32</sup>P], se utilizaron placas de sílica gel H preparadas con una solución de oxalato de potasio al 1% p/v, y los lípidos se resuelven en un sistema compuesto de Cloroformo: acetona: metanol: Ac. Acético: agua (C:A:M:AcAc:H<sub>2</sub>O, 40:15:13:12:7,5 v/v). Los lípidos se visualizaron por

exposición de la placa a vapores de  $I_2$ , y se identifican adecuadamente usando estándar de lípidos. Se raspan las manchas correspondientes al PA- $[^{32}P]$  (a 2 cm del frente del solvente) y en algunos ensayos, también se raspan las manchas correspondientes a los  $PIP_2$ - $[^{32}P]$  y a los  $PIP$ - $[^{32}P]$  (a 3 y 5 cm del origen, respectivamente), Fig. 7b. Las manchas fueron raspadas y colocadas en viales y luego se procedió para la determinación de la radioactividad.

Cuando el precursor radiactivo fue el DAG- $[^3H]$ , sólo se detectó radioactividad en las manchas correspondientes a PA, MAG y DAG.

Cuando el precursor radiactivo fue el ATP- $[\gamma\text{-}^{32}P]$ , la radioactividad hallada sólo correspondió a PA, PIP,  $PIP_2$ .



**Fig. 7- Cromatografía en capa fina para el aislamiento de PA- $[^3H]$  y PA- $[^{32}P]$**

(a) H:E:AcAc (30:70:2,3) en sílica gel G para la obtención de PA $[^3H]$

(b) C:A:M:AcAc:H<sub>2</sub>O (40:15:13:12:7,5) en sílica gel H y 1% p/v de oxalato de potasio para la obtención de PA- $[^{32}P]$

### 6.5.2 Preparación de micelas de lípido-detergente

Se tomó una alícuota de concentración conocida del sustrato lipídico a utilizar, resuspendida en cloroformo y se secó bajo corriente de nitrógeno en un tubo de teflón. Se resuspendió en el *buffer* de ensayo conteniendo el detergente. La concentración del lípido y del detergente en la micela fue de

4x, de forma tal de lograr la concentración deseada en un volumen de 50  $\mu$ l, para un volumen final de ensayo de 200  $\mu$ l. El tubo conteniendo el lípido en el *buffer*, se sonicó en un sonicador de copa, Branson Digital Sonifier, modelo 450.

### **6.5.3 Análisis de la integridad sinaptosomal**

Se analizó la integridad de la estructura sinaptosomal a fin de evaluar si el agregado de la micela mezcla de sustrato lipídico y detergente, como el sonicado necesario para introducir el ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  a los sinaptosomas, modifican la estructura sinaptosomal. La integridad de la membrana sinaptosomal se analizó por microscopía electrónica de transmisión (TEM) y por microscopía de fluorescencia (MF) usando Rojo Nilo (RN) en una concentración de 1  $\mu$ l/ml en *buffer* de ensayo, partiendo de una madre de RN de 1 mM en acetona. El RN tiene la particularidad de unirse a los fosfolípidos de la membrana, emitiendo una fluorescencia de color rojo, mientras que si se une a los lípidos neutros, emite una fluorescencia amarilla (Brown y col., 1992). Esto permite comprobar si los sinaptosomas son capaces de incorporar el lípido contenido en la micela. Los sinaptosomas tratados con la micela conteniendo el DAG, emitirán una fluorescencia amarilla, mientras que emitirán una fluorescencia roja si son tratados con BE.

#### **6.5.3.1 Análisis de la integridad sinaptosomal por TEM**

El análisis por TEM, se realizó para los sinaptosomas en presencia de las micelas conteniendo el 1,2-dipalmitoilglicerol (DPG) ó el 1-estearoil, 2-araquidonoilglicerol (SAG), ambos a una concentración final de 250  $\mu$ M del lípido DAG y DMSO para una concentración final de 0.1%. Se realizan dos

controles, uno conteniendo sólo el BE y el otro conteniendo DMSO 0.1% v/v. Se procede según el protocolo detallado en la Fig. 8.

### **6.5.3.2 Análisis de la efectividad de incorporación del DAG al sinaptosoma por MF**

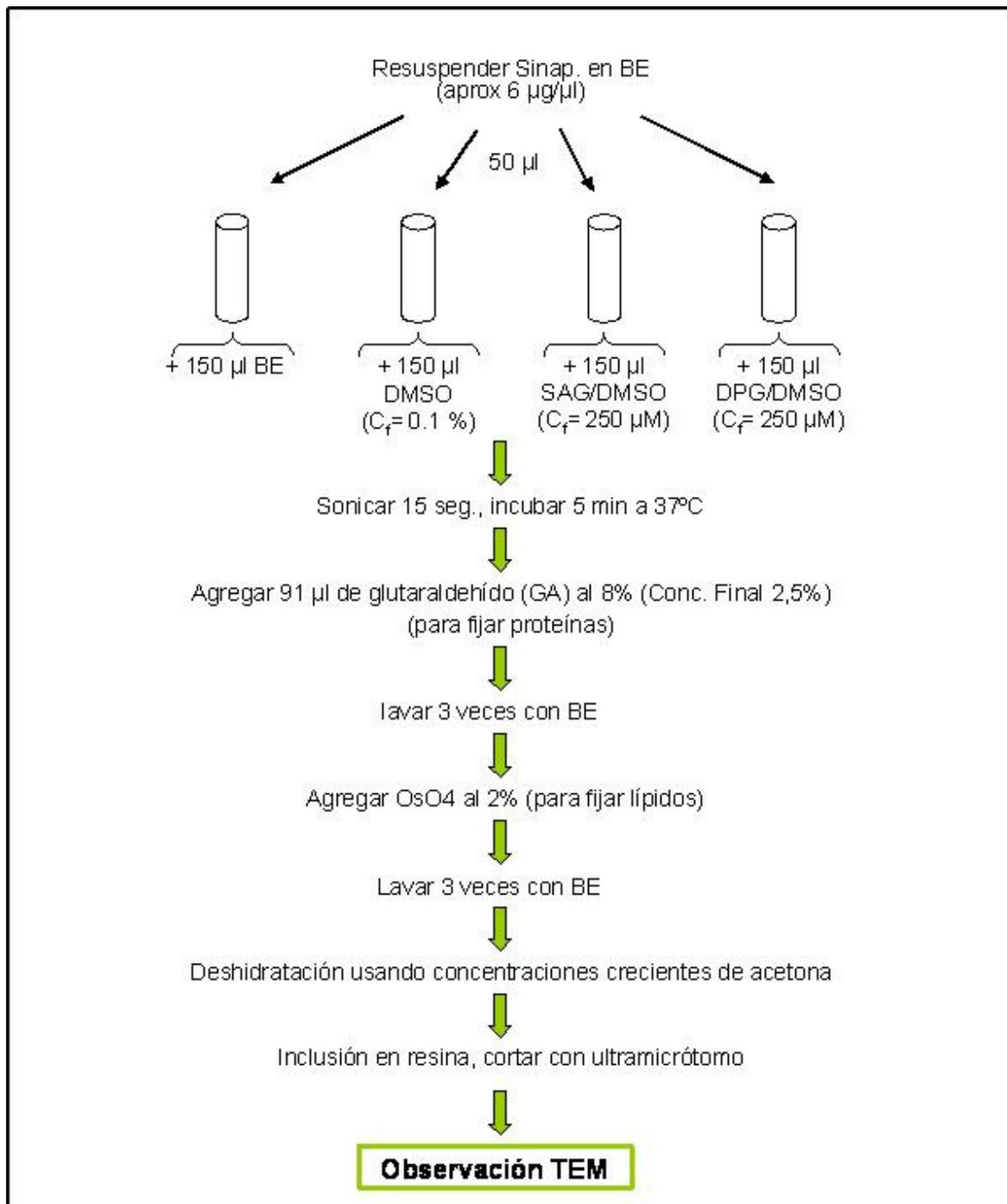
El análisis por MF, se realiza en las mismas condiciones que para TEM. Luego de la incubación, se fijan con 200  $\mu$ l de paraformaldehído al 4 %. Luego de 30 min, la suspensión se centrifuga a 13.500 rpm y el pellet se lava 3 veces con BE. El pellet se resuspende luego en 30  $\mu$ l de BE conteniendo 1  $\mu$ l/ml de una madre de Rojo Nilo de 1 mM en acetona. Se realiza luego la observación por microscopía de fluorescencia, usando un filtro para una longitud de onda de 488 nm.

## **6.6 Ensayo de Pulso-Demarcación**

Para la determinación de la actividad de la fosfolipasa C específica de PIP<sub>2</sub> (PI-PLC), se realizó un ensayo de Pulso-Demarcación. Los sinaptosomas se resuspendieron en el *buffer* de ensayo de la DAGK, conteniendo además, sulfato de litio (LiSO<sub>4</sub> 100  $\mu$ M) sonicando por 15 segundos, en presencia de 10  $\mu$ M de ATP- $[\gamma$ -<sup>32</sup>P] (16  $\mu$ Ci/mg de proteína sinaptosomal). El agregado de litio al *buffer* de reacción, inhibe la enzima inositol-1-fosfatasa (Berridge et al, 1982), evitando la degradación de los diferentes inositoles fosfatos. El Pulso de radioactividad se llevó a cabo a 37°C durante 10 min. El Pulso se frenó por el agregado de *buffer* libre de radiactivo conteniendo 3 mM de ATP. Inmediatamente después de remover una alícuota para el tiempo cero, la suspensión se re-incubó (período de demarcación), durante 1, 4, 5 y 6 min en presencia o ausencia de 100 nM de insulina. A continuación se frenó por el agregado de C:M (1:1, v/v).

### **6.6.1 Separación de los fosfatos-[<sup>32</sup>P] de inositol**

Los fosfatos-[<sup>32</sup>P] de inositol presentes en la fase acuosa se separaron mediante cromatografía de intercambio aniónico. Luego de extraer los lípidos según Folch en medio ácido, como se indicó en la sección 6.5.1, la fase superior acuosa se secó bajo corriente de nitrógeno, a fin de evaporar el metanol. Se agregó Norit-A a fin de eliminar los nucleótidos-[<sup>32</sup>P] remanentes y <sup>32</sup>Pi, agitando por 15 min y dejando por 2 horas en contacto con el adsorbente. Se centrifugó y trasvasó a un tubo plástico conteniendo 200 mg de resina Dowex 1-X8 en solución acuosa, agitando por 15 min y dejando en contacto con la resina por 2 horas. Luego se centrifugó. La resina contenía los [<sup>32</sup>P]-fosfoinosítidos (PIs-[<sup>32</sup>P]) como también restos de nucleótidos-[<sup>32</sup>P] y <sup>32</sup>Pi que pudieron quedar luego del tratamiento con la Norit A. Posteriormente se trató la resina mediante la adición (en *batch*) de 60 partes de ácido fórmico 2,6 M y 40 partes de formiato de amonio 2,6 M, pH 3,45 (vol. total de 4 ml). Se agitó por 15 min, dejando el tratamiento de la resina por 2 horas. Se centrifugó y el sobrenadante conteniendo restos de nucleótidos-[<sup>32</sup>P] y <sup>32</sup>Pi (Isaacks y col., 1977), se descartó. Este tratamiento se repitió 3 veces. Posteriormente se trató la resina con 1 ml de una proporción de 60:40 v/v de ácido fórmico 5 M y formiato de amonio 5 M, pH 3,45 a fin de eluir los fosfatos-[<sup>32</sup>P] de inositol (Isaacks y col., 1977). Esta operación se realizó 2 veces. La cantidad de PIs-[<sup>32</sup>P], se determinó en el extracto acuoso, luego de evaporar hasta un volumen aproximado de 500 µl. Se agregó 6 ml de líquido de centelleo Omnifluor/TX100 y se midió la radioactividad.



**Fig. 8 Protocolo para la observación de la integridad sinaptosomal por TEM**

Los sinaptosomas expuestos a la micela de DAG-DMSO fueron tratados como en los ensayos enzimáticos. Se controló el efecto del detergente y del lípido mediante el tratamiento con BE y DMSO respectivamente.

## **6.7 Métodos analíticos**

### **6.7.1 Cuantificación de la radioactividad**

Los fosfolípidos y los lípidos neutros separados por cromatografía en capa fina, se rasparon de las placas y se transfirieron a viales en los que se agregó 0,2-0,4 ml de agua destilada, de acuerdo con la cantidad de muestra, para desactivar la sílica y 5 ml de líquido de centelleo. El líquido de centelleo utilizado fue una mezcla de 4% de Omnifluor en Tolueno/ Tritón X-100 (4:1, v/v). Se agitó vigorosamente y la radioactividad se midió utilizando un contador de centelleo marca Wallac.

### **6.7.2 Cuantificación de las proteínas**

Para la cuantificación de las proteínas sinaptosomales, se utilizaron los métodos de Lowry o de Bradford. El cálculo de las proteínas se realizó extrapolando el valor de absorbancia de la muestra en una curva estándar realizada con seroalbúmina bovina (BSA) de concentración 1 mg/ml.

#### **6.7.2.1 Método de Lowry**

Para la determinación de las proteínas sinaptosomales utilizando el método de Lowry y col.(LOWRY y col., 1951), las mismas fueron solubilizadas con hidróxido de sodio (NaOH) 1 N. Luego de la transparentización de las muestras, se diluye la normalidad hasta una concentración 0,1 N, alcalinización necesaria para el desarrollo de la reacción colorimétrica. El color resultante se debe a la reacción del Biuret con el ión cúprico en medio alcalino y la reducción del reactivo fosfomolibdico-fosfotúngstico por las tirosinas y triptofanos de las proteínas. La seroalbúmina bovina utilizada

para realizar la curva estándar, se preparó disolviendo 1 mg de la proteína en 1 ml de NaOH 0,1 N.

Dos alícuotas de la solución proteica previamente solubilizadas en NaOH, concentraciones crecientes del estándar de proteínas y un blanco de reactivos, fueron tratados con los reactivos acordes a éste método y las absorbancias fueron medidas con un espectrofotómetro marca JENWAY, modelo Genova, a los 15 min de reacción usando una longitud de onda de 750 nm.

También se utilizó el kit comercial marca Bio-Rad, para la determinación de proteínas por éste método.

### **6.7.2.2 Método de Bradford**

Otro de los métodos utilizado para la determinación de proteínas fue el método de Bradford. Este método se basa en el acoplamiento del colorante azul brillante de Coomassie con las proteínas, teniendo este complejo una absorción máxima a 595 nm que se determina colorimetricamente, con una relación directa entre el desarrollo del color y la concentración de proteínas. Las proteínas para este método son previamente solubilizadas en SDS al 10 % p/v, siendo la concentración final de SDS del 5% p/v. La curva estándar se realiza empleando una solución de seroalbúmina bovina (1 mg/ml) en SDS al 5% p/v.

### **6.7.3 Inmunodetección de proteínas por “western-blot”**

#### **6.7.3.1 Materiales**

- Marcadores de peso molecular preteñidos para geles de SDS, cubetas para electroforesis de proteínas mini-protean (Bio-Rad)

- Reactivo de quimioluminiscencia ECL: Western blotting analysis reagents (Amersham)
- Anticuerpos primarios de conejo policlonales para la DAGK, gentileza del Dr. Matthew Topham de la Universidad de UTA.
- Anticuerpo secundario de cabra para IgG de conejo, conjugado con peroxidasa de rábano (HRP).

### **6.7.3.2 Soluciones**

- *Buffer* de electroforesis: 5 mM Tris, 40 mM glicina, 0,2% SDS pH 8,3.
- Gel de separación: 10% (7,5% ó 12%) Archilamida; 0,26% Bisacrilamida; 375 mM Tris pH 8,8; 0,1% SDS; 0,05% persulfato amónico; 0,05% TEMED.
- Gel de empaquetamiento (Stacking): 3,8% Acrilamida; 0,1% Bisacrilamida; 125 mM Tris pH 6,8; 0,1% SDS; 0,05% persulfato amónico; 0,05% TEMED.
- *Buffer* de transferencia: 48 mM Tris pH 9,2; 39 mM glicina; 20% metanol; 0,035% SDS.
- *Buffer* de Laemmli (4X): 0,250 M Tris-HCl pH 6,8; 20% 2-mercaptoetanol; 40 % Glicerol; 8% SDS; 0,010% azul de bromofenol.

### **6.7.3.3 Preparación de las muestras**

El material biológico se resuspendió en agua ultra-pura para una concentración de proteínas de aproximadamente 5 µg/µl. La concentración de proteínas se determinó usando el método de Bradford o el de Lowry (Materiales y Métodos, 6.7.2.1 y 2. Posteriormente se diluyó con el *buffer* de Laemmli (4X), en una proporción de 1:3 (Laemmli:Muestra).

### **6.7.3.4 Electroforesis de proteínas**

Las muestras en el *buffer* de Laemmli, fueron tratadas por 3 minutos a

100°C. Se sembraron 15 µl (aprox. 60 µg) en las calles de un gel de SDS-PAGE al 7,5% de acrilamida (para proteínas con peso molecular mayor a 80 kDa) separando las proteínas por electroforesis a 20 mA durante 2 horas (aprox.) en una minicubeta.

### **6.7.3.5 Transferencia e inmunodetección**

Para transferir las proteínas del gel a las membranas de PVDF (Immobilon, Millipore) se procedió como indica la técnica de transferencia del sistema Trans-Blot SD (Bio-Rad), a 350 mA durante 1 hora utilizando *buffer* de transferencia.

Para la detección de las proteínas de estudio se procedió de la siguiente manera:

- Bloqueo de la membrana durante 2 horas a T<sup>o</sup> ambiente con 5% de leche en polvo descremada (Sveltesse de Molico) en solución TBS/0,1% Tween 20 (*polyoxyethylenesorbitan monolaurate*, Sigma).
- Incubación 1 hora a T<sup>o</sup> ambiente con agitación suave, con el anticuerpo primario específico para las proteínas de interés, diluido en solución de bloqueo.
- 3 lavados de 5 minutos con TBS/0,1% Tween.
- Incubación con el anticuerpo secundario frente a IgG de conejo (dil. 1:2000) conjugado con peroxidasa de rábano (HRP), durante 2 horas a T<sup>o</sup> ambiente y suave agitación, y siempre preparados en solución de bloqueo.
- 3 lavados de 5 minutos con TBS/0,1% Tween.
- Revelado mediante quimioluminiscencia con el reactivo ECL, empleando placas fotográficas (Hiperfilm<sup>TM</sup>, Amersham®) para visualizar las bandas.

### **6.7.4 Inmunodetección de proteínas microscopía de fluorescencia**

Otro método empleado para explorar la presencia de isoformas de la DAGK presentes en los sinaptosomas de CC y de hipocampo de ratas, fue el empleo de la técnica de inmunofluorescencia.

### **6.7.4.1 Materiales**

- Anticuerpos primarios de conejo policlonales para la DAGK, gentileza del Dr. Matthew Topham de la Universidad de Utah.
- Anticuerpo secundario de cabra anti-inmunoglobulina G de conejo, conjugada con la sonda fluorescente verde (Jackson Inmuno Research Laboratories).

### **6.7.4.2 Soluciones**

- Solución de fijación: Paraformaldehído al 4% p/v, pH 7,4
- *Buffer* HBS conteniendo 142 mM de NaCl, 2,4 mM de KCl, 1,2 mM de  $K_2HPO_4$ , 1 mM de  $MgCl_2$ , 1 mM de  $CaCl_2$  y 10 mM de HEPES a pH 7,4
- Solución de permeabilización: *Buffer* HBS conteniendo Tritón X 100 al 0,1% p/v.
- Solución de bloqueo: leche descremada al 2% p/v en HBS.

### **6.7.4.3 Preparación de las muestras**

Las membranas sinaptosomales fueron fijadas con paraformaldehído (PF) al 4% para una concentración de PF del 2%, durante 30 min a temperatura ambiente (TA). Luego los sinaptosomas fueron lavados 3 veces con *buffer* HBS, centrifugando a 13.500 rpm por 5 min cada vez. Las membranas fueron luego permeabilizadas con Tritón X 100 al 0,1% en HBS durante 15 min a TA. Luego de 3 lavados con HBS los sitios inespecíficos de la proteína de interés fueron bloqueados con leche descremada al 2% p/v en HBS

durante 6 horas. Posteriormente se incubó con el anticuerpo primario anti-DAGK en una dilución de 1:100 en la solución de bloqueo durante toda la noche. Al día siguiente se lavaron 4 veces con HBS y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con la sonda fluorescente en una dilución de 1:200 en la solución de bloqueo. Se lavaron 3 veces centrifugando cada vez. Se resuspendieron en HBS al doble del volumen del pellet, y se procedió a la observación en un microscopio de fluorescencia usando un filtro de longitud de onda de 488 nm. El control negativo se realizó utilizando el mismo procedimiento con sinaptosomas expuestos al anticuerpo secundario y en ausencia de anticuerpo primario.

### **6.8 Métodos estadísticos para analizar los datos experimentales**

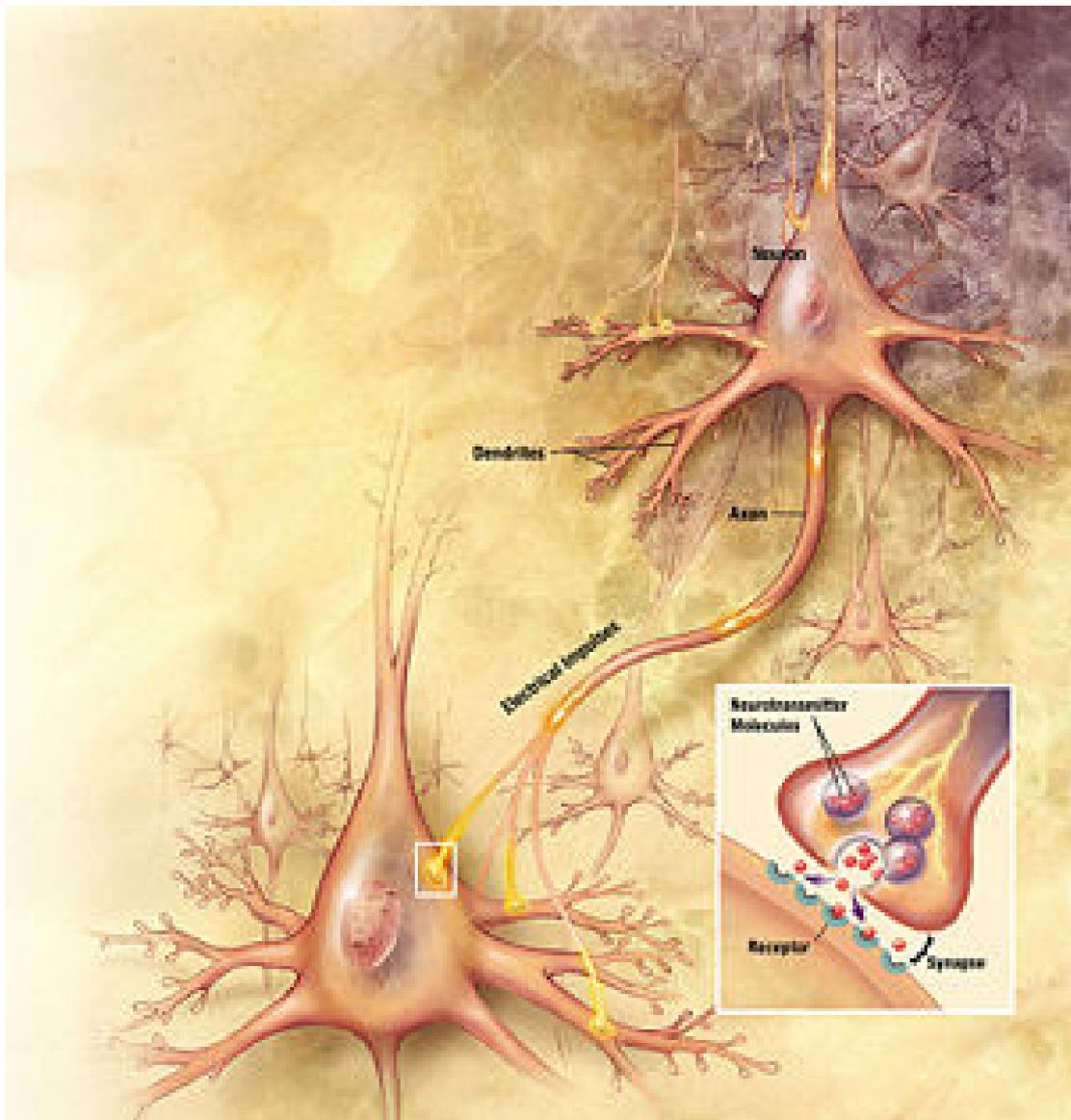
Para determinar la significatividad de los cambios obtenidos entre las condiciones experimental y control se utilizó el *test "t" de Student* de dos colas. En los casos en donde se comparan más de dos condiciones, se empleó para el análisis estadístico el ANOVA de una vía con el posterior *test* de Tukey. En el caso de datos provenientes de una relación calculada a partir de porcentajes, se utilizó un tratamiento estadístico que permite estimar el valor del desvío estándar (SD) por la relación entre las medias y sus desvíos (Johnson y Kotz, 1969).

Los grados de significatividad, *p*, se expresan en la leyenda de las figuras.

---

# Resultados

---



Los resultados de la presente tesis se encuentran organizados en tres capítulos, cuyo contenido se describe a continuación.

**Capítulo I:** “*Caracterización de la actividad DAGK, en sinaptosomas de CC de ratas adultas*”. En este capítulo se estudiaron las características de la actividad de la DAGK del material biológico en estudio. Se evaluó el uso de distintos detergentes como vehiculizadores del sustrato lipídico DAG. Se evaluaron los parámetros cinéticos de la reacción enzimática a partir del sustrato lipídico endógeno (aquel que se encuentra en la membrana sinaptosomal) como también a partir del aporte exógeno de DAG de diferente composición en acilos.

**Capítulo II:** “*Mecanismo de activación de la DAGK por la insulina, en sinaptosomas de corteza cerebral de ratas adultas*”. En este capítulo se estudió la acción de la insulina sobre la actividad de la DAGK de los sinaptosomas de CC de ratas adultas, evaluando los mecanismos dependientes de la activación de vías fosfolipásicas por acción de la insulina, mecanismo por el cual se genera el sustrato DAG, como también mecanismos de activación que son independientes del aporte de sustrato, usando DAG exógeno como herramienta experimental.

**Capítulo III:** “*Estudio de la activación de la DAGK por acción de la insulina, en el SNC de ratas seniles*”. En este último capítulo se estudiaron los efectos del envejecimiento sobre la actividad de la DAGK de membranas del SNC relacionadas con el aprendizaje y la memoria, evaluando el rol de la insulina como factor neuroprotector. Este capítulo presenta resultados preliminares, que siguen siendo tema de análisis.

## Capítulo I: Caracterización de la actividad de la DAGK, en sinaptosomas de CC de ratas adultas

La diacilglicerol quinasa (DAGK) cataliza la reacción de formación de PA mediante la fosforilación del hidroxilo libre en el 1,2 diacilglicerol, utilizando como co-sustrato al ATP.

Para el ensayo de la actividad enzimática, al ser la DAGK una enzima bi-sustrato, es posible utilizar dos herramientas experimentales para su análisis, cuya diferencia radica en el sustrato radiomarcado utilizado. De este modo, podemos emplear:

- 1) ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ , midiendo como producto PA- $[\text{}^{32}\text{P}]$ , ó
- 2) DAG- $[\text{}^3\text{H}]$ , midiendo como producto PA- $[\text{}^3\text{H}]$

Para el ensayo enzimático en donde se utilizó DAG- $[\text{}^3\text{H}]$ , el mismo fue obtenido por incubación de retinas bovinas con glicerol- $[\text{}^3\text{H}]$ , metodología por la cual, a partir de la síntesis *de novo*, obtenemos entre otros lípidos el DAG marcado en la posición 2 de la cadena de glicerol (Materiales y Métodos, 6.3.1). A partir de esta metodología, además del DAG- $[\text{}^3\text{H}]$ , podemos aislar TAG- $[\text{}^3\text{H}]$ , el cual puede luego ser hidrolizado a partir de una lipasa, obteniendo así DAG- $[\text{}^3\text{H}]$  (Materiales y Métodos, 6.3.2).

Tanto el DAG- $[\text{}^3\text{H}]$  directamente biosintetizado, como el TAG- $[\text{}^3\text{H}]$ , a partir del cual obtenemos DAG- $[\text{}^3\text{H}]$ , son analizados para determinar su composición en ácidos grasos, por cromatografía de reparto gas-líquido, como se indicó previamente (Materiales y Métodos, 6.4).

El siguiente cuadro detalla la composición en ácidos grasos del DAG y TAG de retinas bovinas. Para comparar las diferencias en la composición de los DAGs obtenidos de una u otra forma presentamos los valores expresados en mol%. Se observa que son similares en la composición de sus acilos, especialmente si evaluamos la proporción global de ácidos saturados e insaturados.

Ac. Graso	ME de AG (DAG) (nmol/100 mg prot)	% AG en DAG	% AG en TAG
<b>16:0</b>	<b>93.99 ± 12.75</b>	<b>32</b>	<b>30</b>
16:1	12.32 ± 4.09	4	
<b>18:0</b>	<b>59.79 ± 2.71</b>	<b>20</b>	<b>19</b>
<b>18:1</b>	<b>48.85 ± 6.2</b>	<b>16</b>	<b>20</b>
18:2	2.37 ± 0.82	1	
<b>20:4</b>	<b>39.25 ± 4.05</b>	<b>13</b>	<b>6</b>
22:5	5.78 ± 1.04	2	
<b>22:6</b>	<b>35.67 ± 5.63</b>	<b>12</b>	<b>17</b>

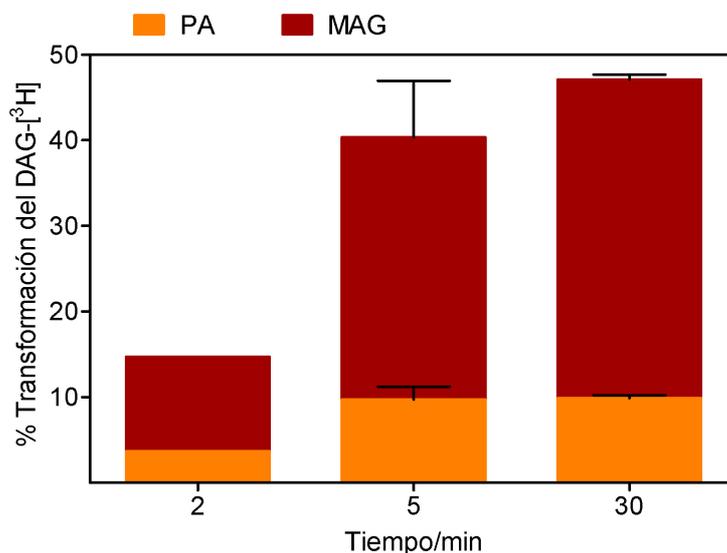
Tabla II. Composición en ácidos grasos del DAG-[<sup>3</sup>H] y TAG-[<sup>3</sup>H] de retina bovina.

### 7.1 Estudio de las actividades enzimáticas de sinaptosomas de la corteza cerebral de ratas, involucradas en la metabolización del DAG exógeno (DAGe).

Para muchas de las enzimas que utilizan o producen diacilglicéridos, se utilizan como sistemas de ensayo, micelas mixtas de lípido-detergente para solubilizar los sustratos o los productos lipofílicos. Un detergente comúnmente utilizado para el ensayo de la actividad DAGK, es el β-Octil glucósido (OG) (Zhou y Roberts, 1997).

En los ensayos enzimáticos realizados para medir la actividad DAGK a partir de DAG-[<sup>3</sup>H] como sustrato a distintos tiempos de incubación, se observó

que el DAG de retina (de composición variada en ácidos grasos) ofertado en micelas de OG es transformado hacia distintos productos. El aislamiento de los lípidos realizado por cromatografía en capa fina (Materiales y Métodos, 6.5.1) permitió determinar que principalmente se degrada hacia la formación de MAG. En la Fig. 10 podemos observar que la transformación del sustrato DAG alcanza desde un 15% a un 45% (PA + MAG), mientras que la distribución de la radioactividad entre PA y MAG revela que la formación de MAG se encuentra favorecida en aproximadamente un 80%.



**Fig. 10- Metabolización del DAG en sinaptosomas de CC en función del tiempo de reacción**

Los sinaptosomas fueron incubados en presencia de 130  $\mu\text{M}$  de DAG- $^3\text{H}$  de retina de composición descrita en la tabla II (AE= 1100 dpm/nmol) en presencia de 50 mM de OG y de 1 mM de ATP. La reacción se inició con el agregado de la suspensión de membrana sinaptosomal durante 2, 5 y 30 min a 37°C. Las distintas condiciones fueron ensayadas por triplicado y los resultados fueron expresados como el promedio del porcentaje de transformación del DAG  $\pm$  SD.

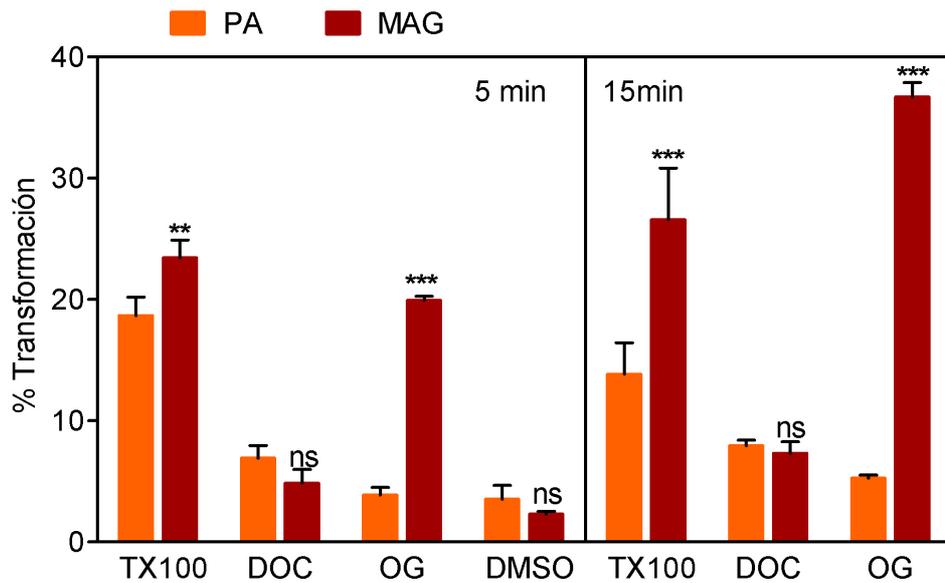
Este resultado indicó una baja eficiencia para medir la actividad DAGK ya que solo se detecta entre un 15 y 20 % de transformación a PA. Es

importante indicar que en estas condiciones de ensayo no se halló formación de ácido lisofosfatídico. La producción de MAG por una actividad lipásica sería la responsable de la rápida transformación del sustrato original. Por éste motivo, en una primera etapa, el objetivo fue determinar las mejores condiciones de ensayo para la DAGK evaluando la metabolización del DAG exógeno (DAGe) ofertado en micelas de distintos detergentes.

### **7.1.1 Efectos de detergentes en la metabolización del DAGe**

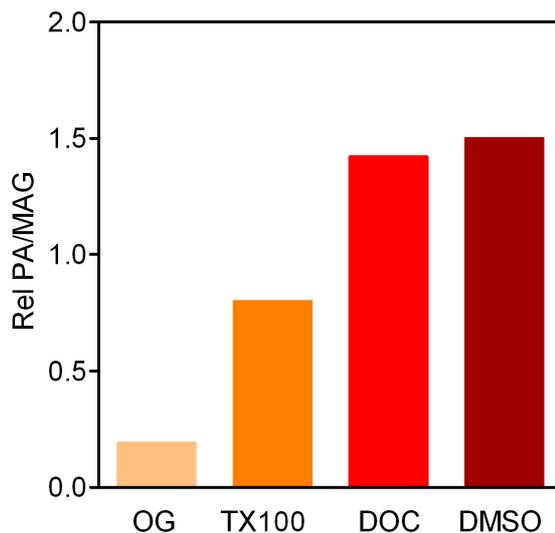
Para evaluar la metabolización del DAG exógeno, el sustrato lipídico se resuspendió en distintos detergentes, a fin de analizar cuáles son las mejores condiciones para favorecer la actividad quinasa. En la Fig. 11, se muestra la transformación del DAGe en las distintas micelas deterativas. Se puede observar que tanto en los ensayos de corto plazo (5 min) como en los ensayos a 15 min, la transformación del sustrato hacia la formación de PA (DAGK) se ve favorecida cuando el DAG se encuentra en micelas formadas con Tritón X-100. Sin embargo, en incubaciones más largas (15 min), la transformación hacia MAG (vías lipásicas), adquiere mayor importancia usando éste detergente.

Si comparamos la relación entre la formación de PA y MAG (Fig. 12), podemos observar que el DOC o el DMSO favorecen la reacción de formación de PA por la DAGK.



**Fig. 11- Transformación del DAG en sinaptosomas de CC**

Se utilizó como sustrato exógeno 130  $\mu\text{M}$  de DAG- $^3\text{H}$  de retina de composición descrita en la tabla II (AE= 1100 dpm/nmol), en presencia de 2 mM de ATP. La concentración del detergente utilizada para disolver el DAG- $^3\text{H}$  fue para el Tritón X-100 de 15 mM, para el Deoxicolato de Sodio (DOC) de 1 mM, para el  $\beta$ -Octilglucósido (OG) de 50 mM y para el Dimetilsulfóxido (DMSO) de 0.1 %. La reacción se inició con el agregado de la suspensión de membrana sinaptosomal durante 5 y 15 min a 37°C. Las distintas condiciones fueron ensayadas por triplicado y los resultados fueron expresados como el promedio del porcentaje de transformación del DAG  $\pm$  SD. \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 comparando la formación de MAG vs. PA para cada tiempo y detergente utilizado.

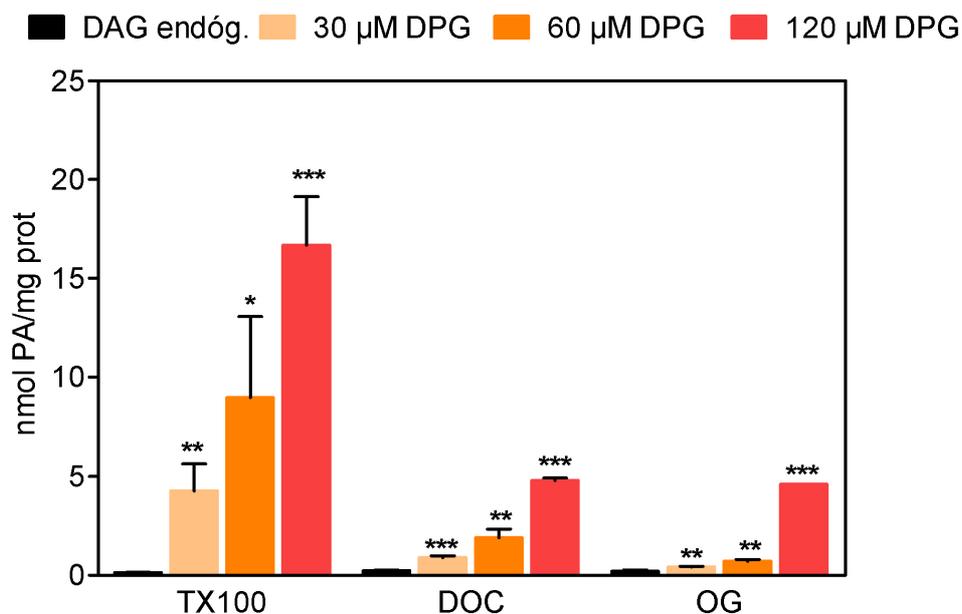


**Fig. 12- Transformación del DAG en sinaptosomas de CC. Relación PA/MAG**

A partir de los resultados expresados en la figura anterior, se representa la relación entre la formación de PA y la formación de MAG a partir de DAG, luego de 5 min de incubación para cada detergente ensayado.

### 7.1.2 Dependencia de la actividad DAGK con la concentración de sustrato.

Para evaluar la cinética de transformación en función de la concentración del diacilglicérido, se utilizó 1,2-dipalmitoilglicerol (DPG) en concentraciones crecientes y en presencia de 50  $\mu\text{M}$  de DAG- $^3\text{H}$  de retina (AE original = 1100 dpm/nmol) en todos los casos. De esta manera se varía la AE del sustrato marcado empleando 5 concentraciones de DAG. La actividad se midió en el medio de ensayo ya indicado (Apartado 6.5).

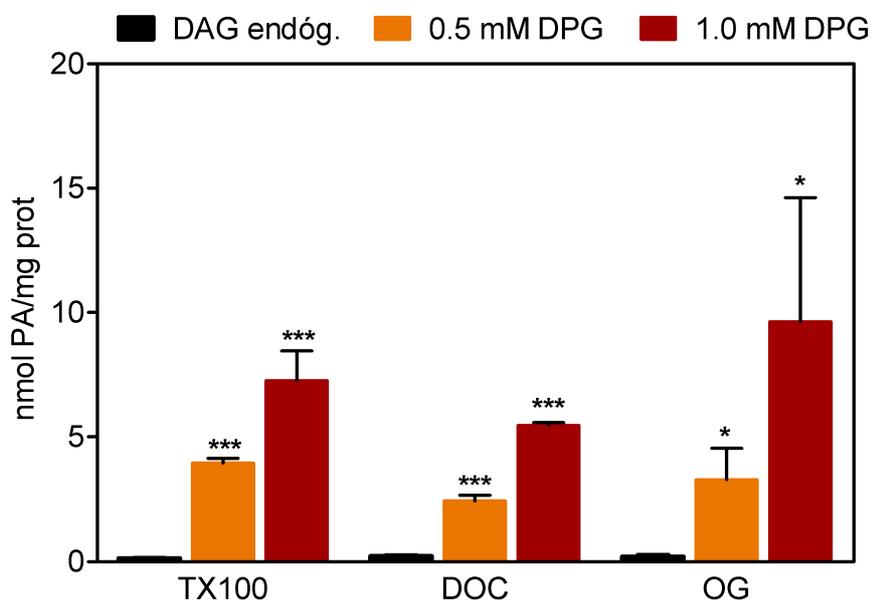


**Fig. 13- Actividad de la DAGK sinaptosomal en presencia de concentraciones crecientes de DPG. Concentraciones bajas de DPG**

Las concentraciones utilizadas de 1,2-dipalmitoilglicerol (DPG) fueron de 30, 60 y 120  $\mu\text{M}$  en presencia de 1 mM de ATP. Se utilizó como precursor radiactivo 50  $\mu\text{M}$  de DAG- $^3\text{H}$  de retina (AE original = 1100 dpm/nmol). El lípido fue resuspendido en 15 mM de Tritón X-100, 1 mM de DOC ó 50 mM de OG. La reacción se inició con el agregado de la suspensión de membrana sinaptosomal durante 5 min a 37°C. Las distintas condiciones fueron ensayadas por triplicado y los resultados fueron expresados como el promedio  $\pm$  SD. \* $p < 0.020$ , \*\* $p < 0.0095$ , \*\*\* $p < 0.0004$  comparando las distintas concentraciones de DPG vs. DAG endógeno para cada detergente utilizado.

Como podemos observar en la figura 13, la actividad de la DAGK sinaptosomal aumenta al aumentar la concentración del sustrato en presencia de diferentes detergentes. Se puede observar además que, dicha actividad es significativamente superior en presencia de Tritón X-100 respecto a lo que ocurre cuando el sustrato es ofertado en DOC u OG.

Además realizamos un ensayo similar, pero utilizando concentraciones de DPG de 0,5 y 1,0 mM.



**Fig. 14- Actividad de la DAGK sinaptosomal en presencia de concentraciones crecientes de DPG. Concentraciones altas de DPG**

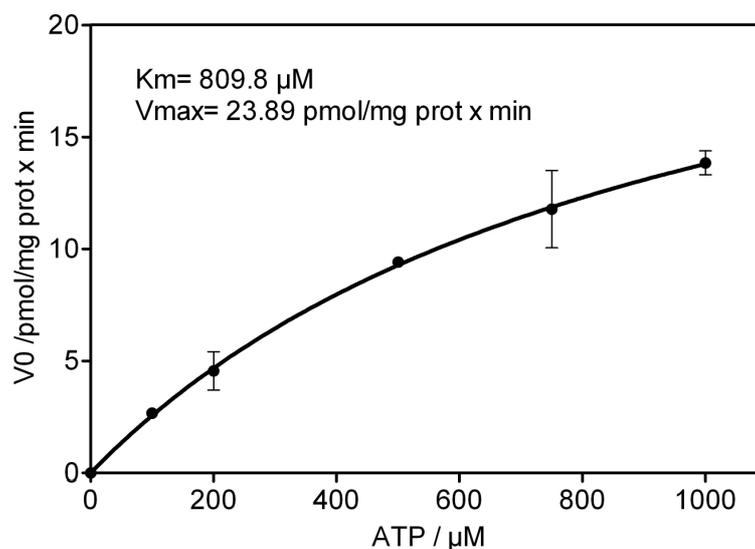
Las concentraciones utilizadas de 1,2-dipalmitoilglicerol (DPG) fueron de 0,5 y 1,0 mM. Las demás condiciones fueron como en la Fig. 13. \*p < 0.030, \*\*\*p < 0.0004 comparando las distintas concentraciones de DPG vs. DAG endógeno para cada detergente utilizado.

En la Fig. 14 también podemos observar que la actividad de la DAGK sinaptosomal aumenta al aumentar la concentración del sustrato. Sin embargo, la actividad enzimática medida fue similar en presencia de los 3 detergentes ensayados.

## 7.2 Estudio cinético de la actividad DAGK sinaptosomal

### 7.2.1 Cinética enzimática basal

En un primer ensayo experimental, se evaluó la cinética enzimática utilizando como sustrato lipídico el DAG endógeno con una concentración aproximada de 25  $\mu\text{M}$  (cuantificada por fase gaseosa) y variando la concentración de ATP hasta una concentración de 1000  $\mu\text{M}$ . La Fig. 15, muestra que la velocidad de reacción sigue una cinética de Michaelis-Menten, siendo la  $K_m$  aparente de 809,8  $\mu\text{M}$  y la  $V_{\text{max}}$  aparente de 23,89  $\text{pmol PA} / \text{mg prot} \times \text{min}$ .

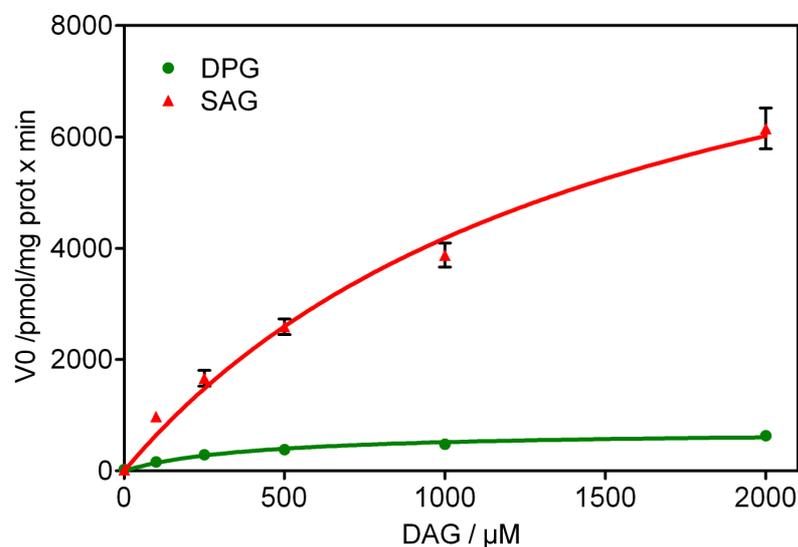


**Fig. 15- Actividad de la DAGK sinaptosomal en función de la concentración de ATP**

Se utilizó DAG endógeno y concentraciones crecientes de ATP hasta 1 mM, utilizando como precursor radiactivo ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  a razón de 3  $\mu\text{Ci}$  por muestra para aquellas condiciones en que la concentración de ATP fue de hasta 200  $\mu\text{M}$  y 6  $\mu\text{Ci}$ , para concentraciones superiores de ATP. La reacción se inició con el agregado de la suspensión de membrana sinaptosomal durante 5 min de reacción a 37  $^{\circ}\text{C}$ , previa sonicación durante 15 segundos a fin de introducir el ATP a los sinaptosomas.

### 7.2.2 Cinética enzimática en presencia de DAGs exógenos.

Tal como se indicó en la introducción, 9 de las 10 isoformas de la DAGK no poseen preferencia en la utilización de diacilglicéridos con una composición definida de acilos. La única isoforma que prefiere DAGs que contienen ácido araquidónico (20:4) en la posición 2, es la isoforma épsilon (DAGK $\epsilon$ ). Es por ello que para una primera aproximación a un estudio cinético donde se ofertó sustrato lipídico exógeno, se utilizaron dos tipos de lípidos para medir la actividad DAGK: uno de composición saturada en ácidos grasos, el 1,2-dipalmitoilglicerol (DPG) y otro de composición insaturada, el 1-estearoil, 2-araquidonoilglicerol (SAG). Este tipo de ensayo nos permitiría detectar, en base a preferencias de utilización de sustrato, la existencia de una actividad DAGK $\epsilon$ .

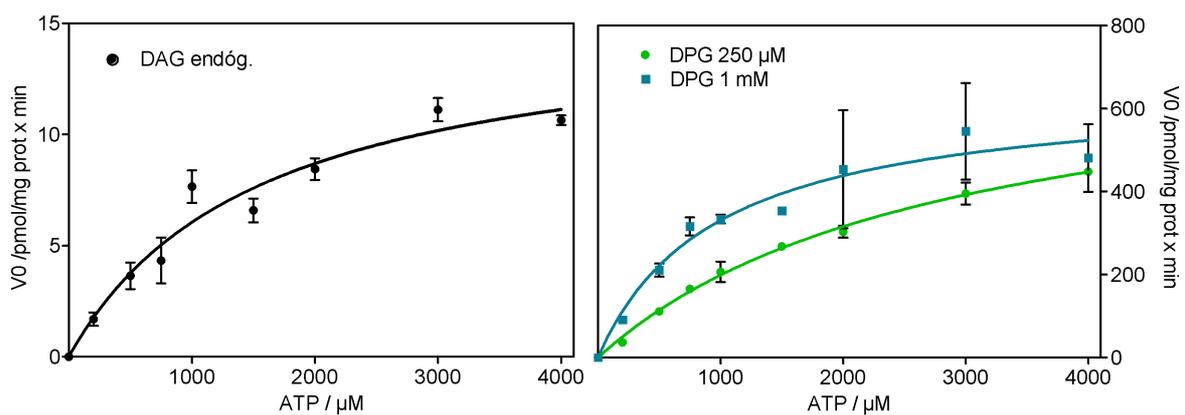


**Fig. 16- Actividad DAGK a 1 mM de ATP y concentraciones variables de DPG y SAG**

Se utilizaron concentraciones crecientes de DPG ó SAG hasta 2 mM en micelas de 50 mM de OG y manteniendo constante la concentración de ATP a 1 mM. El precursor radiactivo utilizado fue el ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  a razón de 6  $\mu\text{Ci}$  por muestra. La reacción se llevó a cabo como en la Fig. 15.

Como podemos observar en la Fig. 16, a 1 mM del co-sustrato ATP, la actividad enzimática sobre el sustrato SAG es significativamente superior a la correspondiente sobre DPG, sin alcanzar el nivel de saturación de la enzima a 2 mM de este DAG poliinsaturado.

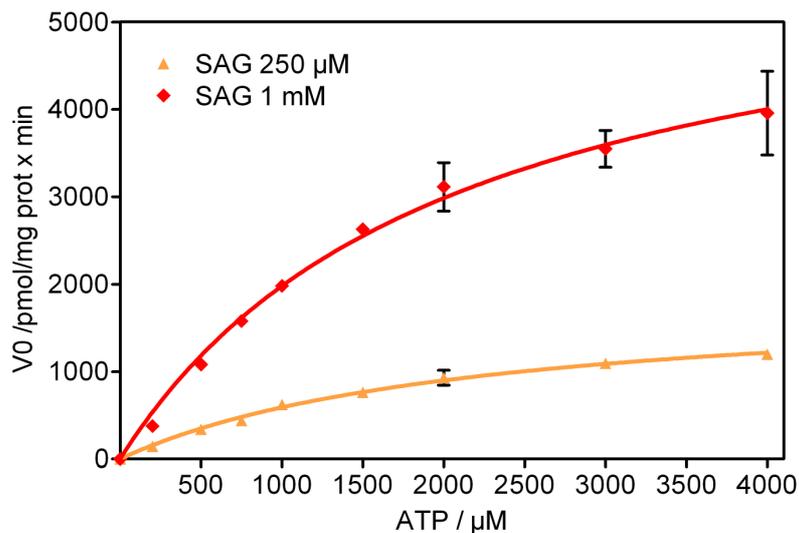
Para explorar las condiciones de saturabilidad para cada uno de los sustratos, a fin de realizar los ensayos de cinética, se realizó una nueva curva de actividad, pero en este caso manteniendo constante la concentración de lípido y variable la de ATP, trabajando a tres concentraciones de DAG. La Fig. 17 resume los resultados obtenidos cuando el sustrato lipídico fue el DPG.



**Fig. 17- Actividad DAGK con DAG endógeno, 250  $\mu\text{M}$  y 1 mM de DPG variando la concentración ATP**

Se utilizaron tres concentraciones fijas de DAG: niveles endógenos (aprox. 25  $\mu\text{M}$ ), 250  $\mu\text{M}$  y 1 mM de DPG en presencia de 50 mM de OG. Las concentraciones de ATP utilizadas fueron hasta 4 mM, utilizando como precursor radiactivo ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  a razón de 5  $\mu\text{Ci}$  por muestra para aquellas condiciones en que la concentración de ATP fue de hasta 1 mM y 10  $\mu\text{Ci}$ , para concentraciones superiores de ATP. La reacción se llevó a cabo como en la Fig. 15.

En las mismas condiciones se midió la actividad enzimática para las dos concentraciones de DAG exógeno utilizadas en el ensayo anterior, pero utilizando SAG como sustrato. En la Fig. 18 se observan los resultados.

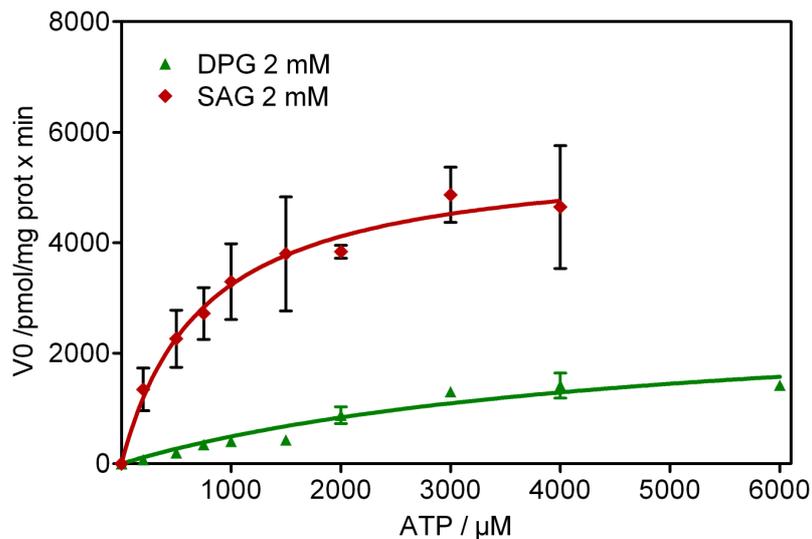


**Fig. 18- Actividad DAGK con 250  $\mu\text{M}$  y 1 mM de SAG a diferentes concentraciones de ATP**

Se utilizaron concentraciones fijas de SAG: 250  $\mu\text{M}$  y 1 mM en presencia de 50 mM de OG. Las concentraciones de ATP utilizadas fueron hasta 4 mM, utilizando como precursor radiactivo ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  en las mismas condiciones que en la Fig. 17. La reacción se llevó a cabo como en la Fig. 15.

Como podemos observar en la Fig. 18, el sistema es capaz de convertir el sustrato SAG con una altísima eficiencia sin alcanzar, en 250  $\mu\text{M}$  ó 1 mM de SAG, la máxima velocidad de reacción. Por este motivo se realizó una nueva curva de actividades pero usando concentraciones más altas del sustrato SAG, de 2 mM. También se evaluó la actividad en presencia de DPG a esta misma concentración.

En la figura 19 se observa que a 2 mM de SAG y a 2 mM de ATP se ha alcanzado la saturación. En el caso del DPG se presentan datos obtenidos a 6 mM de ATP para confirmar dicha saturación.

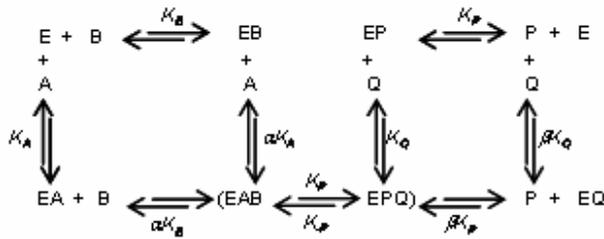


**Fig. 19- Actividad DAGK con 2 mM de DPG y SAG a diferentes concentraciones de ATP**

Se utilizaron concentraciones fijas de DPG y SAG (2 mM) en presencia de 50 mM de OG. Las concentraciones de ATP utilizadas fueron hasta 6 mM, utilizando como precursor radiactivo ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  en las mismas condiciones que en la Fig. 17. La reacción se llevó a cabo como en la Fig. 15.

La DAGK es una enzima bi-sustrato, que utiliza un sustrato soluble (ATP) y un sustrato hidrofóbico (DAG). Las reacciones bi-sustrato constituyen aproximadamente un 60 % de las reacciones bioquímicas conocidas. Según el modelo cinético se clasifican en tres tipos: (1) reacciones al azar o tipo *random*, (2) reacciones secuenciales ordenadas y (3) reacciones Ping Pong (Segel, 1993). En las reacciones secuenciales, tanto ordenadas como al azar, los sustratos se combinan con la enzima antes de que se liberen los productos, mientras que en las reacciones tipo Ping-Pong, se liberan uno o más productos, antes de que se hayan incorporado todos los sustratos. La tabla III resume las reacciones enzimáticas bi-sustrato.

**Reacciones secuenciales al azar**



Los sustratos A y B se unen a la enzima aleatoriamente, el primero en unirse, cambia la constante de disociación del segundo en un factor  $\alpha$ . Los productos P y Q pueden liberarse al azar y el primero en liberarse cambia la constante de disociación del segundo en un factor  $\beta$ .

*Ecuación del sistema*

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[A][B]}{\alpha K_A K_B + \alpha K_A [B] + \alpha K_B [A] + [A][B]}$$

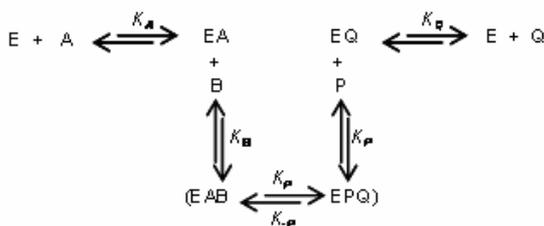
*Dependencia del sustrato A*

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[A]}{\alpha K_A \left[ 1 + \frac{K_B}{[B]} \right] + [A] \left[ 1 + \frac{\alpha K_B}{[B]} \right]}$$

*Dependencia del sustrato B*

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[B]}{\alpha K_B \left[ 1 + \frac{K_A}{[A]} \right] + [B] \left[ 1 + \frac{\alpha K_A}{[A]} \right]}$$

**Reacciones secuenciales ordenadas**



Los sustratos se combinan con la enzima en un determinado orden. Primero se une el *sustrato activador*, A, formando el complejo EA y luego el *segundo sustrato*, B, formando el complejo EAB.

*Ecuación del sistema*

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[A][B]}{K_A K_B + K_B [A] + [A][B]}$$

*Dependencia del sustrato A*

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[A]}{\left[ K_A \frac{K_B}{[B]} \right] + [A] \left[ 1 + \frac{K_B}{[B]} \right]}$$

*Dependencia del sustrato B*

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[B]}{K_B \left[ 1 + \frac{K_A}{[A]} \right] + [B]}$$

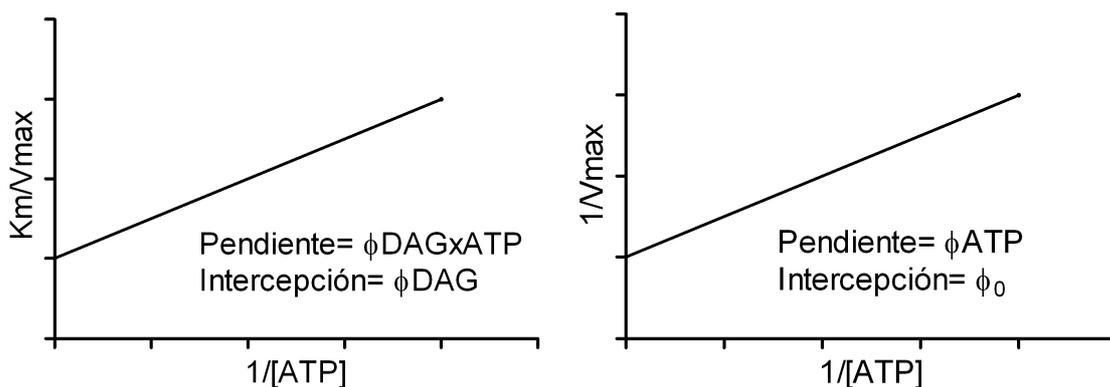
<b>Reacciones Ping-Pong</b>	
<p>Uno o más productos se liberan antes de que se hayan incorporado todos los sustratos.</p>	<p><i>Ecuación del sistema</i></p> $\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[A][B]}{K_B[A] + K_A[B] + [A][B]}$
	<p><i>Dependencia del sustrato A</i></p> $\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[A]}{K_A + [A] \left[ 1 + \frac{K_B}{[B]} \right]}$
	<p><i>Dependencia del sustrato B</i></p> $\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[B]}{K_B + [B] \left[ 1 + \frac{K_A}{[A]} \right]}$

**Tabla III. Resumen de las reacciones enzimáticas bi-sustrato.**

La cinética de estas enzimas, no solo podrían depender de la afinidad de la enzima por sus sustratos, sino también de la unión de la enzima a la membrana lipídica (Wattenberg y col., 2006). Los parámetros cinéticos deberían ser estudiados para cada isoforma en particular, en un sistema que permita variar las concentraciones de cada uno de los sustratos involucrados en la reacción enzimática.

En nuestro sistema experimental, con la complejidad natural de una fracción subcelular enriquecida en terminales sinápticos, no se cuenta con las isoformas aisladas, lo cual hace imposible realizar un análisis cinético estricto. Hemos comprobado (inmunodetección) más de una isoforma de la

DAGK en nuestro modelo experimental de sinaptosomas de corteza cerebral y de hipocampo, por lo cual el estudio cinético arroja valores para  $K_m$  y  $V_{max}$  aparente y aproximados que resultan del promedio de actividades de las isoformas presentes. A partir de la ecuación de Dalziel (DALZIEL y O'BRIEN, 1957), para reacciones enzimáticas bi-sustrato, se evalúan los parámetros cinéticos. Los mismos se obtienen representando según Lineweaver Burk,  $1/V_0$  versus  $1/[ATP]$ , manteniendo la concentración de DAG constante, para una serie de distintas concentraciones de DAG. Las pendientes ( $K_m/V_{max}$ ) y las intercepciones con el eje Y ( $1/V_0$ ) de cada gráfico, son representados en gráficos secundarios, para obtener los coeficientes cinéticos  $\phi$ , como muestra la Fig. 20.



**Fig. 20- Representaciones gráficas secundarias. Ecuación de Dalziel**

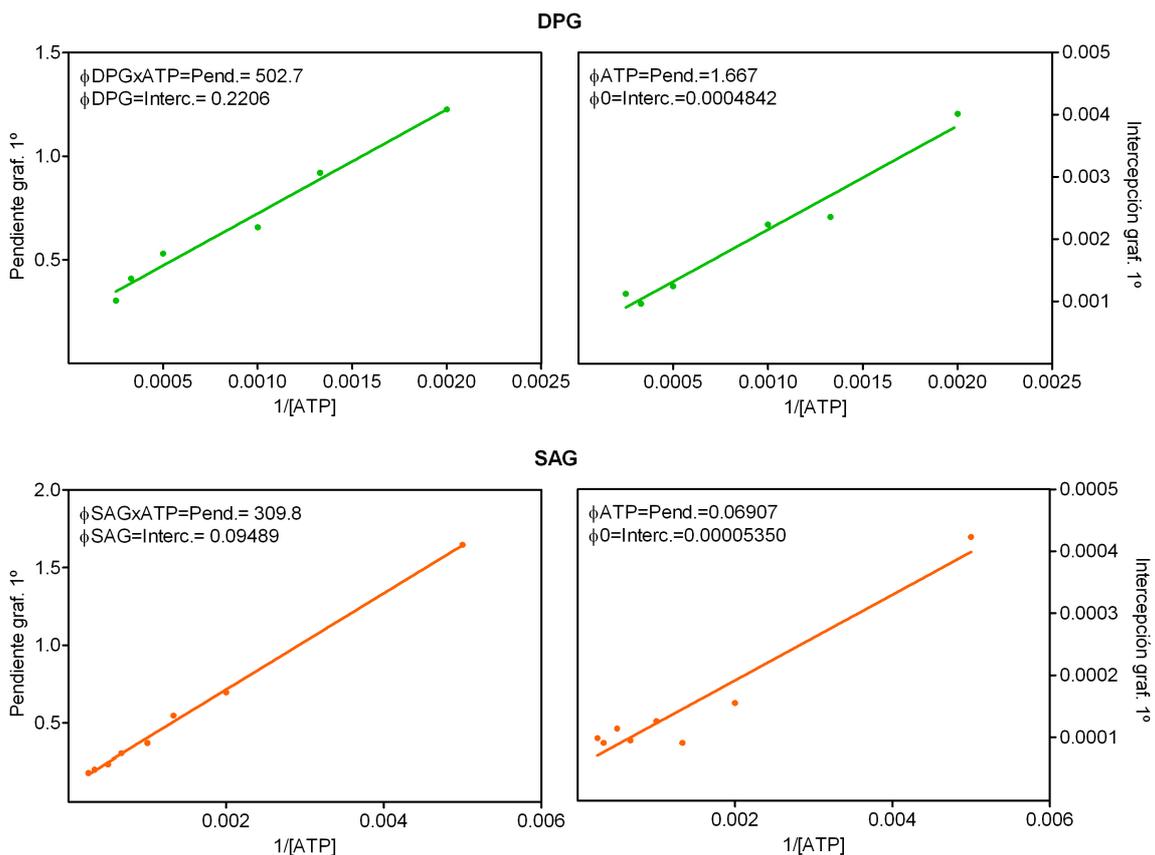
Las pendientes ( $K_m/V_{max}$ ) y las intercepciones con el eje Y ( $1/V_0$ ) de la ecuación de Lineweaver Burk obtenidas para una serie de concentraciones de ATP constantes y en función de  $1/[DAG]$ , son graficadas en función de  $1/[ATP]$  para obtener los parámetros cinéticos de la ecuación de Dalziel para reacciones bi-sustrato.

De éstos gráficos secundarios, se obtienen los valores  $\phi_0$ ,  $\phi_{DAG}$ ,  $\phi_{ATP}$  y  $\phi_{DAG \times ATP}$ . De la misma forma si graficamos en función de la concentración de DAG, manteniendo constante la concentración de ATP y a distintos valores del mismo, obtenemos los mismos resultados. De esta manera y según la ecuación de Dalziel, obtenemos los valores para  $K_m^{DAG} = \phi_{DAG}/\phi_0$ ,

$Km^{ATP} = \phi ATP / \phi_0$  y  $Ks^{DAG} = \phi DAG \times ATP / \phi ATP$ .  $Km^{DAG}$  es la concentración de DAG que alcanza  $\frac{1}{2}$  de la  $V_{max}$ , cuando la concentración de ATP es saturante;  $Km^{ATP}$  es la concentración de ATP que alcanza  $\frac{1}{2}$  de la  $V_{max}$ , cuando la concentración de DAG es saturante y  $Ks^{DAG}$  es la constante de disociación para  $E-DAG \rightarrow E + DAG$ .

Se utilizaron DAGs de diferente composición a fin de establecer la afinidad por el DAG en el sistema experimental.

Los datos de las curvas se analizaron según la ecuación de Dalziel, graficando las pendientes y las intercepciones de los gráficos primarios ( $1/V_0$  vs.  $1/[DAG]$ ) vs  $1/[ATP]$ . Fig. 21.



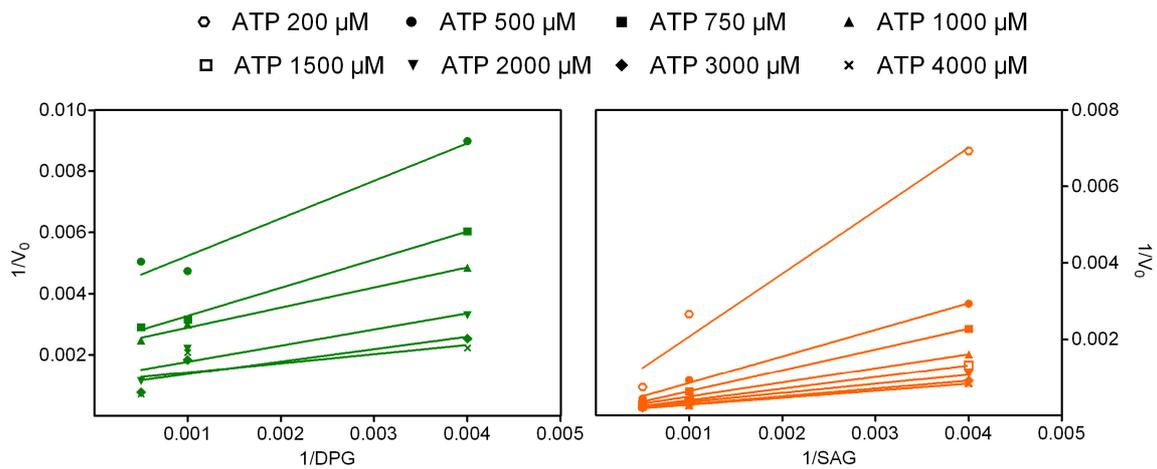
**Fig. 21- Representaciones gráficas de la ecuación de Dalziel**

Las pendientes ( $Km/V_{max}$ ) y las intercepciones ( $1/V_0$ ) de la ecuación de Lineweaver Burk obtenidas para una serie de concentraciones de ATP constantes y en función de  $1/[DAG]$ , son graficadas en función de  $1/[ATP]$

Así, los parámetros cinéticos fueron:

- $K_m^{DAG} = 455,73 \mu M$ ;  $K_m^{ATP} = 3,45 \text{ mM}$  y  $V_{max} = 2,07 \text{ nmol PA/mg prot x min}$  para DPG y
- $K_m^{DAG} = 1771,34 \mu M$ ;  $K_m^{ATP} = 1,29 \text{ mM}$  y  $V_{max} = 18,70 \text{ nmol PA/mg prot x min}$  para SAG.

Para los mecanismos de reacción que obedecen a la ecuación de Dalziel, las representaciones gráficas primarias de Lineweaver Burk  $1/V_0$  vs.  $1/[DAG]$  a las distintas concentraciones fijas de ATP, son lineales, como muestra la Fig. 22.



**Fig. 22- Representaciones gráficas primarias de Lineweaver Burk**

Se representa  $1/V_0$  en función de  $1/[DAG]$  (DPG o SAG) para una serie de concentraciones constantes de ATP.

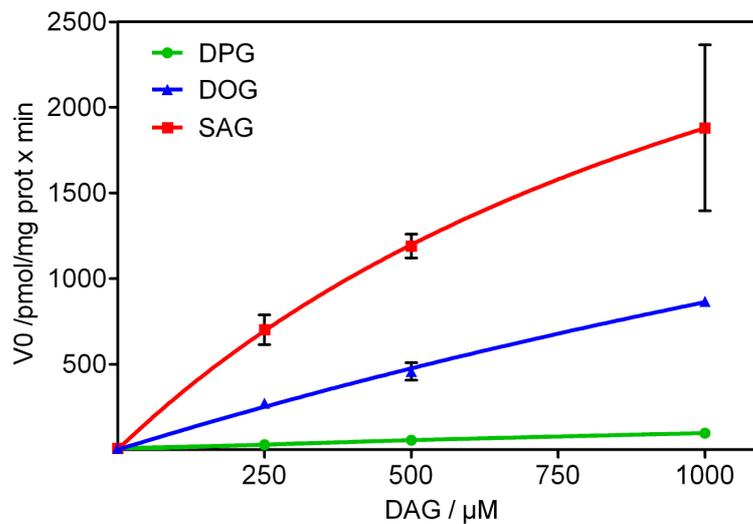
Las reacciones enzimáticas que proceden en forma secuencial, sea ordenada o al azar, responden a éste tipo de gráficos, en donde las pendientes decaen a medida que aumenta la concentración del sustrato que se mantiene constante para cada valor del otro sustrato, mientras que en las reacciones de tipo Ping-Pong, las pendientes de cada curva, son paralelas

entre sí. Como se muestra en la Fig. 22 la actividad DAGK responde a una reacción de tipo secuencial, aunque no podemos distinguir con éstos resultados, si se trata de una reacción ordenada o al azar.

### **7.3 Comparación de la actividad de la DAGK sobre sustratos de diferente composición en ácido grasos**

La gran avidez por el sistema para transformar el SAG, fue llamativa. Una pregunta surgía de estos estudios y era si en verdad la actividad de la DAGK de sinaptosomas en las condiciones ensayadas, preferencialmente utilizaba el SAG como sustrato respondiendo a una actividad del tipo de la DAGK épsilon ó si el DPG, al ser un lípido altamente saturado, era incapaz de disolverse adecuadamente en el sistema micelar utilizado. Por tal motivo, decidimos ensayar la actividad enzimática en presencia de 1,2-dioleoilglicerol (DOG), que al poseer un cierto grado de insaturabilidad, es más soluble que el DPG. El ensayo se realizó a 4 mM de ATP, para asegurar la saturabilidad con respecto al co-sustrato y en presencia de concentraciones crecientes de DAG hasta 1 mM, comparando los tres DAG entre sí: el SAG, el DOG y el DPG.

Como podemos observar en la Fig. 23, a pesar de que la actividad enzimática en presencia de DOG, es superior que en presencia de DPG, la DAGK sinaptosomal utiliza preferencialmente el SAG en este sistema experimental. Ha sido reportado que la DAGKζ, quien utiliza otros DAGs insaturados muestra preferencia por DOG (Thirugnanam y col., 2001). Este resultado también indicaría que no se trata de la isoforma DAGK zeta, apoyando la hipótesis de que se trataría de la DAGKε.



**Fig. 23- Actividad DAGK utilizando SAG, DOG y DPG como sustratos lipídicos y en presencia de 4 mM de ATP**

Se utilizaron concentraciones crecientes de DPG, DOG y SAG hasta 1 mM en presencia de 50 mM de OG. La concentración de ATP utilizada fue de 4 mM, utilizando como precursor radiactivo ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  a razón de 8  $\mu\text{Ci}$  por muestra. La reacción se inició con el agregado de la suspensión de membrana synaptosomal durante 5 min de reacción a 37 °C, previa sonicación durante 15 segundos a fin de introducir el ATP a los sinaptosomas.

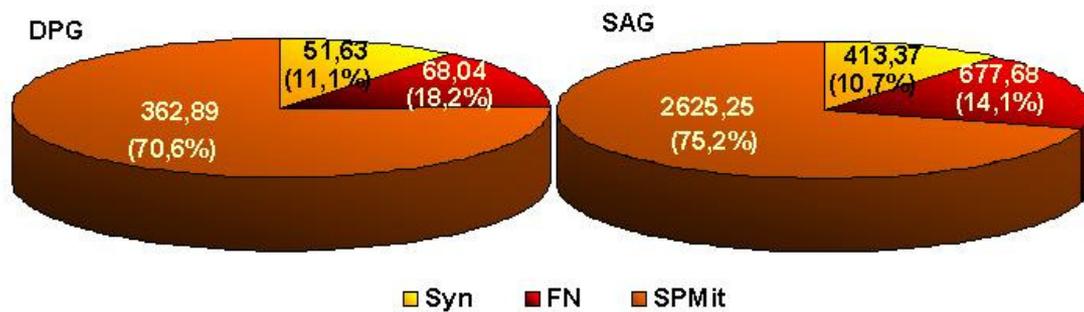
### 7.3.1 Estudio de la actividad DAGK en las distintas fracciones subcelulares de corteza cerebral de rata.

Como se mencionó en la introducción, las distintas isoformas de la DAGK se distribuyen diferencialmente a nivel de tejido y a nivel subcelular, siendo el SNC el tejido en donde se expresan la mayoría de las isoformas descritas hasta el momento. Ha sido reportado que la DAK $\epsilon$  está presente en las membranas del retículo endoplásmico (RE) (Goto y col., 2008). Nuestro sistema experimental, para el estudio de la DAGK, comprende a los terminales sinápticos obtenidos de neuronas de la corteza cerebral y del hipocampo. Dichas preparaciones purificadas muestran en su interior las estructuras subcelulares características, mitocondrias, vesículas sinápticas y una proporción escasa aunque presente, de retículo endoplásmico. Una

hipótesis que surgía a partir de la marcada actividad de la DAGK en presencia de SAG, era que si mayoritariamente medíamos en los sinaptosomas una actividad principalmente debida a la DAGK $\epsilon$ , entonces el porcentaje de distribución de la actividad sería similar en presencia de ambos sustratos. Además la actividad medida sería menor en los sinaptosomas que sólo contienen en su interior una porción del RE con respecto a la fracción del SPMit que contiene la fracción de RE de la célula neuronal.

La Fig. 24 representa la distribución porcentual de la actividad medida en las fracciones sinaptosomal, nuclear y sobrenadante post-mitocondrial provenientes CC de ratas adultas de 4 meses en presencia de DPG ó SAG. Si bien en presencia de SAG, la actividad enzimática medida fue aproximadamente 7 veces superior que en presencia de DPG, la distribución porcentual para ambos sustratos permaneció invariable.

Como se puede observar, la actividad DAGK en sinaptosomas de CC representa el 10,91 % de la actividad total, sin embargo el porcentaje de distribución en el SPMit es de un 72,9 %. Estos hallazgos sugieren, en coincidencia con lo reportado, que esta actividad observada se debe a la isoforma épsilon de la DAGK, presente en la fracción que contiene al retículo endoplásmico. La actividad hallada en la fracción sinaptosomal purificada se hallaría en la porción de retículo presente en el terminal sináptico. En el Capítulo II se presentan estudios de MF con anticuerpo contra DAGK $\epsilon$ , donde se muestra la localización intrasinaptosomal de la enzima Fig. 49.



**Fig. 24- Distribución de la actividad de la DAGK en distintas fracciones de CC de ratas adultas**

Las distintas fracciones subcelulares se obtuvieron de acuerdo a lo detallado en Materiales y Métodos, Fig. 4. La concentración de DPG y SAG fue de 250  $\mu$ M en presencia de 50 mM de OG. La concentración de ATP utilizada fue de 500  $\mu$ M, utilizando como precursor radiactivo ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  a razón de 3  $\mu$ Ci por muestra. La reacción se inició con el agregado de la suspensión de membrana sinaptosomal durante 5 min de reacción a 37  $^{\circ}$ C, previa sonicación durante 15 segundos a fin de introducir el ATP a los sinaptosomas.

Los valores expresan las actividades medidas en cada fracción en pmoles de PA/mg proteínas, indicando en paréntesis el porcentaje de distribución en cada caso.

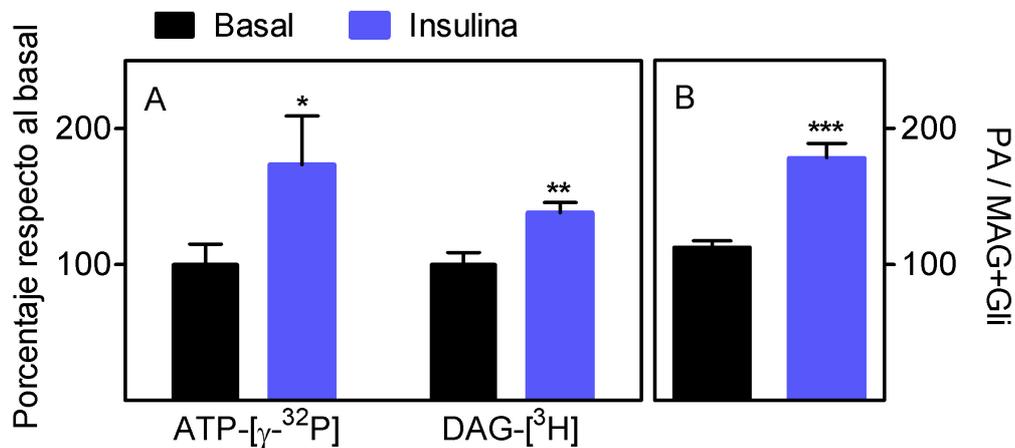
## Capítulo II: Mecanismo de activación de la DAGK por acción de la insulina, en sinaptosomas de corteza cerebral de ratas adultas

En este Capítulo se presentan los resultados de los estudios realizados para determinar la participación de la DAGK en la vía de señalización de la insulina en el SNC. Para evaluar la acción de la insulina, los sinaptosomas fueron incubados en presencia de ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ , utilizando como sustrato lipídico el DAG endógeno. Este tipo de ensayo depende de la disponibilidad del DAG generado a partir de los fosfolípidos de la membrana por acción de distintas vías enzimáticas (PLD/PAP2, PC-PLC, PI-PLC).

Para independizarnos de las variaciones del sustrato endógeno, que puede aumentar por actividades fosfolipásicas, también se evaluó el efecto de la insulina sobre la actividad de la DAGK, utilizando sustrato DAG radiactivo en micelas con DMSO al 0,1% v/v.

La figura 25A muestra que la insulina incrementa la formación de PA a partir del DAG endógeno en un 73% respecto al control, mientras que el incremento es del 46% a partir del DAG exógeno (DAG radiactivo). Bajo estas condiciones, también fue posible observar la metabolización del DAG radiactivo empleado, evaluando el MAG y el glicerol como producto soluble. La figura 25B representa la relación entre la actividad DAGK (PA- $[\text{}^3\text{H}]$ ) y la actividad hidrolítica (DAG lipasa y MAG lipasa), midiendo el MAG- $[\text{}^3\text{H}]$  y el glicerol- $[\text{}^3\text{H}]$ , respectivamente. Como se puede observar en la Fig. 25B, la

insulina favorece la actividad quinásica, aumentando la relación PA vs MAG + Glicerol en un 58 % respecto al control sin la hormona.



**Fig. 25- Efecto de la insulina sobre la actividad de la DAGK sinaptosomal, medida a partir de sustrato exógeno o de sustrato endógeno.**

(A) La actividad DAGK fue medida a partir del DAG endógeno y ATP-[ $\gamma$ - $^{32}$ P] a razón de 3  $\mu$ Ci por muestra ó en presencia de 200  $\mu$ M de DAG radiactivo con una actividad específica de 800 dpm/nmol. La concentración de ATP para ambos ensayos fue de 1 mM. La concentración de insulina fue de 100 nM. Los basales contenían seroalbúmina bovina (BSA), vehículo de la insulina, en una concentración final de 0,1% p/v. El tiempo de reacción fue medido a partir del agregado de la membrana sinaptosomal seguido de 15 segundos de sonicación e inmediato agregado de la insulina o de la BSA en el caso de los basales. El ensayo se realizó por un período de 5 min en un baño incubador a 37°C.

(B) Representa la relación PA/MAG+Glicerol productos obtenidos a partir del ensayo con DAG-[ $^3$ H].

Cada condición se ensayó por triplicado. Los resultados se expresan como el porcentaje de actividad respecto al valor basal (100%)  $\pm$  SD. \*p < 0.03, \*\*p < 0.005, \*\*\*p < 0.0006 comparando la condición insulina vs. Basal.

Con ambos precursores se observa que la hormona estimula la formación de PA. El mayor efecto que ejerce la insulina, observado cuando se usó ATP-[ $\gamma$ - $^{32}$ P] en el ensayo (73% versus 46% en el ensayo con DAG-[ $^3$ H]), sugería un estímulo adicional al producido por el incremento del DAG en la membrana.

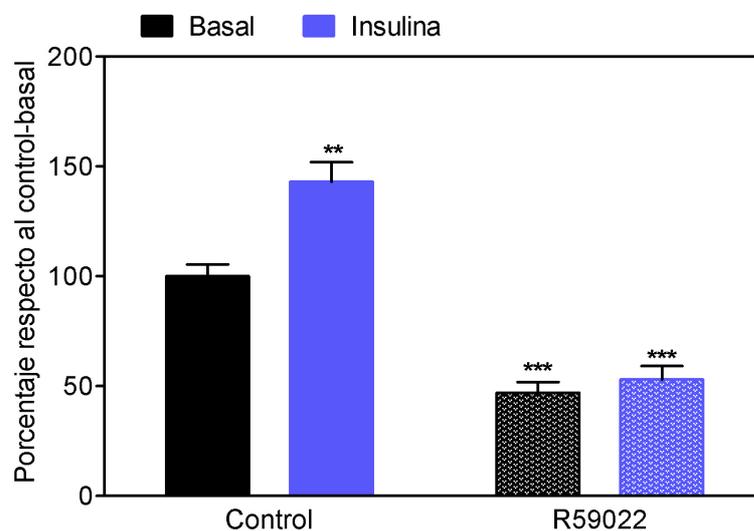
De ésta manera, los resultados podrían indicar que la insulina estimula la formación de PA por dos mecanismos, a saber:

- 1) un mecanismo dependiente de la generación de DAG, formados a partir de fosfolípidos de la membrana por acción de enzimas estimuladas por la hormona,
- 2) un mecanismo independiente de la generación de DAG, siendo la hormona la responsable de activar a la DAGK en forma directa o a través de mecanismos aún no establecidos.

Además, se sabe que la insulina incrementa la vía *de novo* de glicerolípidos en varios tejidos. Suponiendo que el PA radiactivo fue sintetizado por la vía *de novo* a través de la acilación de glicerol 3 fosfato radiactivo, esto podría ser la causa del mayor estímulo observado en presencia del precursor ATP. Sin embargo, en experimentos previamente realizados en el laboratorio con membranas sinaptosomales incubadas con glicerol-[<sup>3</sup>H], precursor para la síntesis de glicerolípidos, se observó que la marcación de los glicerofosfolípidos era significativa solo a tiempos largos de incubación (60, 90 y 120 min), (datos no publicados). Entonces, aunque fuera posible que en los ensayos con ATP-[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P], encontráramos PA-[<sup>32</sup>P] proveniente de la síntesis *de novo*, el aporte de éstos a tiempos cortos de incubación, no serían significativos. Además, en experimentos realizados en nuestro grupo de trabajo con membranas sinaptosomales, se observó que a tiempos cortos de incubación (5-10 min) y empleando PA marcado radiactivamente como precursor, la fosfatidato fosfohidrolasa (PAP) tipo 2 (PAP2) fue la actividad predominante, mientras que no se detectó actividad de PAP1, ésta última asociada esencialmente a la síntesis *de novo* de glicerolípidos (Salvador y col., 2002).

Por otra parte, una eventual inhibición de PAP por parte de la insulina, acción que de ocurrir podría producir una acumulación de PA radiactivo, fue descartada ya que la enzima (PAP2) no modifica su actividad por acción de la hormona (Salvador y col., 2005).

Para confirmar la participación genuina de una actividad DAGK en el efecto de la insulina, se evaluó el efecto de la hormona en presencia del inhibidor selectivo para la DAGK R59022 (Jiang y col., 2000).

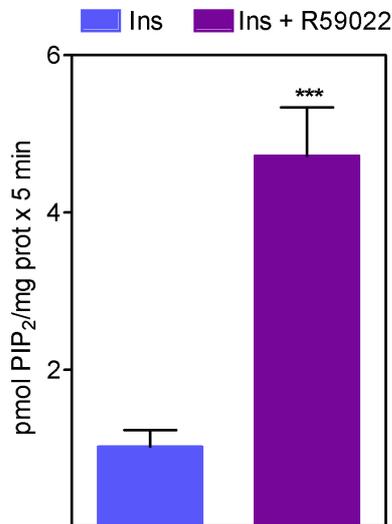


**Fig. 26- Efecto del R59022 en la acción de la insulina sobre la DAGK**

El ensayo se realizó preincubando las membranas sinaptosomales durante 10 min en presencia de 10  $\mu\text{M}$  del inhibidor R59022 disuelto en DMSO para una concentración final del detergente del 0.1%. El tiempo de reacción fue medido a partir del agregado de 100  $\mu\text{M}$  de ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ , seguido de 15 segundos de sonicación e inmediato agregado de la insulina o de la BSA en el caso de los basales. El ensayo se realizó a 37°C durante 5 min. Cada condición se ensayó por triplicado. Los resultados expresan el porcentaje PA formado /mg proteína x 5 min respecto al valor basal (100%)  $\pm$  SD. \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 comparando cada condición vs. Control-Basal.

Como podemos observar en la Fig. 26, en presencia del R59022, la formación de PA se reduce significativamente. En estas condiciones, la insulina no ejerce efecto estimulador en la formación de PA.

El estímulo en la formación de PA por acción de la insulina en nuestro sistema experimental, está asociado a la activación de la DAGK.



**Fig. 27- Efecto del R59022 en la acción de la insulina (Ins) sobre los niveles de PIP<sub>2</sub>**

El ensayo se realizó en las mismas condiciones que para la Fig. 26.

Cada condición se ensayó por triplicado. \*\*\*p < 0.0006, para Ins+R59022 vs. Insulina.

Llamativamente, mientras el R59022 inhibe la formación del PA activado por la insulina (Fig. 26), los niveles de marcación de los PIP<sub>2</sub> aumentan en presencia de la hormona (Fig. 27).

Se ha demostrado que la actividad de las quinasas que fosforilan fosfoinosítidos no son significativamente afectadas por el inhibidor R59022 (de Chaffoy de Courcelles DC y col., 1985). Este resultado podría estar revelando la existencia de un mecanismo concertado que permite una correlación inversa entre PA y PIP<sub>2</sub>.

#### **7.4 El aumento de los niveles de DAG por acción de la insulina estimula la actividad de la DAGK**

Como se describió anteriormente, la insulina estimula la actividad de la PLD, sin alterar la actividad de la PAP2 (Salvador y col., 2005). La acción de la

PAP2 sobre el aumento de PA generado por la PLD implica, de todas formas, un mecanismo de incremento en la formación de DAG.

En varios tipos celulares, la generación de DAG se produce en forma bifásica luego de un estímulo (Donchenko y col., 1994; Zannetti y col., 1997). Durante la fase inicial, dentro del primer minuto, la producción de DAG está asociado con la hidrólisis del  $PIP_2$ , por acción de la PI-PLC, mientras que la fase tardía proviene de la hidrólisis de la PC por la PLD, seguido de la acción secuencial de la PAP (Fu y col., 1989; Reibman y col., 1988).

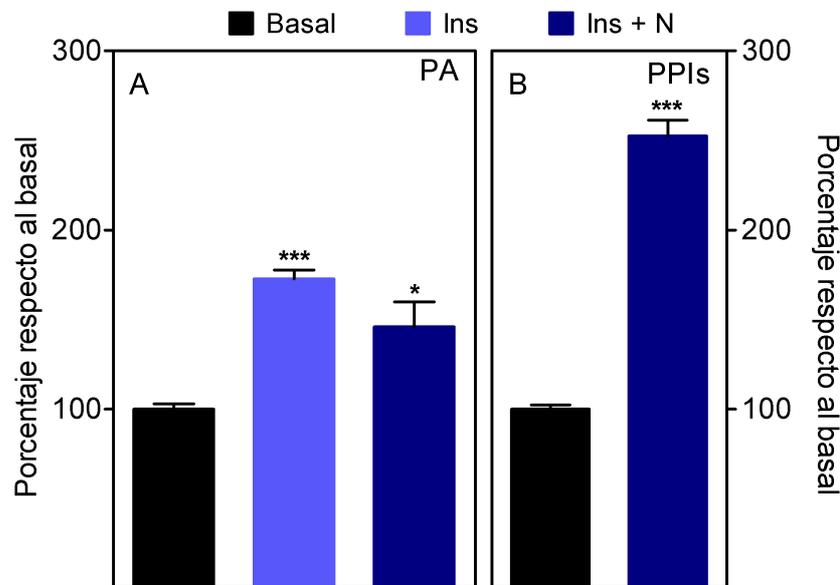
Para explorar el mecanismo de activación de la DAGK por la insulina relacionado al aumento de los niveles endógenos de DAG, evaluamos la eventual participación de la PI-PLC y de la PLD/PAP2, utilizando inhibidores específicos para éstas vías.

#### **7.4.1 - La PI-PLC participa en la activación de la DAGK por efecto de la insulina, aumentando los niveles de DAG**

Para evaluar la participación de la vía PI-PLC se utilizó 100  $\mu$ M de neomicina (N). La neomicina se une al  $PIP_2$ , inhibiendo la actividad de la PI-PLC (Griffin y col., 1980; Schacht, 1976). Lo esperable, en el caso de que el aumento de sustrato DAG provenga de los fosfoinosítidos, era una reducción o anulación del estímulo de la insulina sobre la formación de PA.

El tiempo de incubación fue de 2 min, ya que el pico de DAG proveniente de la activación de la PI-PLC se produce tempranamente. En la figura 28A podemos observar una tendencia inhibitoria a la formación de PA activada por la hormona en presencia de la neomicina. Como control del efecto inhibitorio de la neomicina sobre la actividad de la PI-PLC, se evaluaron los

polifosfoinosítidos (PPIs), midiendo los niveles de fosforilación de PIP+PIP<sub>2</sub> (Fig. 28B).



**Fig. 28- Participación de la vía PI-PLC en la activación de la DAGK por la insulina**

El ensayo se realizó preincubando las membranas sinaptosomales durante 10 min en presencia de 100  $\mu$ M de neomicina (N) disuelto en DMSO para una concentración final del detergente del 0.1%. El tiempo de reacción fue medido a partir del agregado de 100  $\mu$ M de ATP- $[\gamma$ -<sup>32</sup>P], 3  $\mu$ Ci por muestra, seguido de 15 segundos de sonicación e inmediato agregado de la insulina o de la BSA en el caso de los basales. El ensayo se realizó a 37°C durante 2 min.

(A) Medición de PA- $[\gamma$ -<sup>32</sup>P]

(B) Medición de PPIs- $[\gamma$ -<sup>32</sup>P]

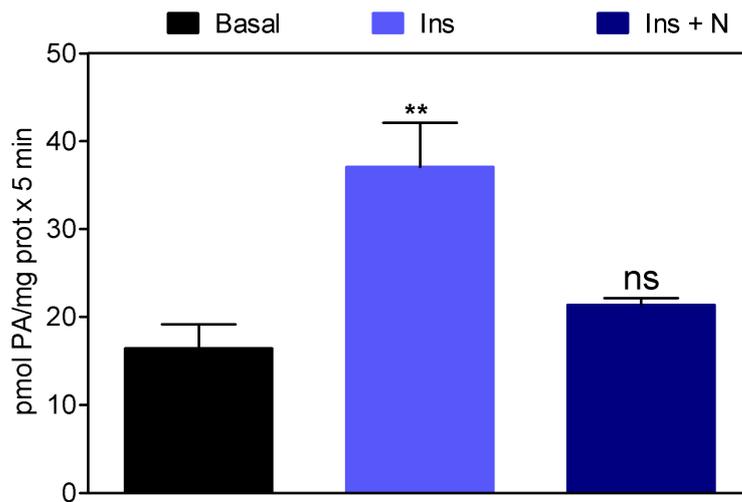
Cada condición se ensayó por triplicado. Los resultados expresan el porcentaje de PA (A) ó PPIs (B) formados por mg proteína x 2 min respecto al valor basal (100%)  $\pm$  SD.

\* $p$ <0.03, \*\*\* $p$ <0.0002 para cada condición vs. Basal.

Como podemos observar en la Fig. 28B, hay una acumulación de los PPIs en presencia de la neomicina. Esto confirma la inhibición de la degradación de estos lípidos.

Llamativamente, la presencia del orto-vanadato permitió observar el efecto inhibitorio de la neomicina respecto al estímulo que ejerce la insulina sobre

la DAGK (Fig. 29). El o-vanadato (200  $\mu$ M) fue usado para preservar la fosforilación en tirosina, por ser este un agente inhibidor de tirosina-fosfatasas, asegurando de esta manera la acción tirosina-quinasa dependiente del receptor de la insulina.

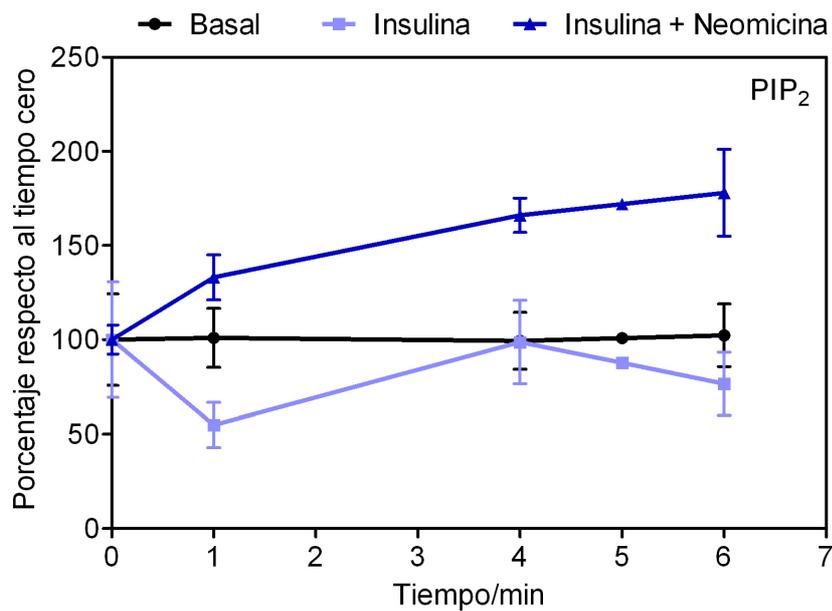


**Fig. 29- Efecto de la neomicina sobre la actividad de la DAGK en presencia de o-vanadato**

El ensayo se realizó en las condiciones de la Fig. 28, pero en presencia de 200  $\mu$ M de o-vanadato en el medio de incubación.

El ensayo se realizó por triplicado. \*\* $p < 0.003$  comparando cada condición vs. Basal.

Dado que el resultado obtenido implicaba indirectamente la participación de una fosfolipasa C en la acción de la insulina, medimos la respuesta a la acción de la hormona sobre los fosfoinosítidos. Para ello se realizó un ensayo de Pulso-Demarcación. Como muestra la figura 30, en la condición control (ausencia de la insulina y ausencia de la neomicina) no se observan cambios en los niveles de  $PIP_2$ . Sin embargo, en presencia de la insulina, se observa una inhibición del 44% en los niveles de  $PIP_2$  al minuto de incubación mientras que en presencia de la neomicina, la insulina no es capaz de producir éste efecto.



**Fig. 30- Ensayo de Pulso-Demarcación para evaluar la participación de la PI-PLC en la acción de la insulina**

El ensayo se realizó preincubando los sinaptosomas durante 10 min en presencia o ausencia de 100  $\mu$ M de neomicina y de 16  $\mu$ Ci de ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  por mg de proteína sinaptosomal, como se detalló en la sección 6.6 y 6.6.1 de Materiales y Métodos. El Pulso de radioactividad se llevó a cabo durante 10 min y el período de Demarcación, durante 1, 4, 5 y 6 min en presencia o ausencia de 100 nM de insulina. Los resultados expresan el porcentaje de radioactividad en PIP<sub>2</sub> por mg proteína respecto al tiempo cero (100%).

Estos datos indican que la PI-PLC es activada por la insulina a tiempos cortos de incubación (1 min), disminuyendo los niveles de PIP<sub>2</sub>. Además, luego de los 4 min de incubación, se observa una posible resíntesis de los PIP<sub>2</sub> por acción de la insulina, mientras que además se observa una acumulación en los niveles de PIP<sub>2</sub> en presencia de la neomicina. Debemos tener en cuenta que el diseño experimental utilizado permitió disminuir fuertemente los niveles de ATP radiactivo pero no eliminó del medio a dicho precursor. Este resultado confirma lo observado en la Fig. 28, que muestra resultados de una experiencia con insulina y neomicina en presencia de

precursor radiactivo, donde la fosforilación de los polifosfoinosítidos está triplicada.

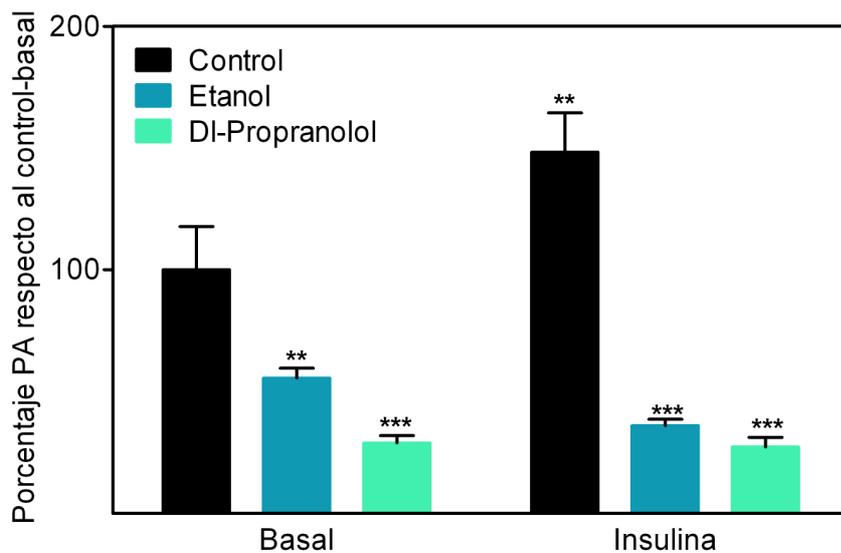
#### **7.4.2 - La vía PC-PLD/PAP2 participa en la activación de la DAGK por efecto de la insulina, aumentando los niveles de DAG**

Para evaluar la participación de la vía PC-PLD/PAP2 en la activación de la DAGK por la insulina, se utilizaron como inhibidores de la vía, etanol al 2% y DL-Propranolol a 1,5 mM. Los alcoholes primarios promueven el mecanismo de transfosfatidilación de la actividad de la PC-PLD, generando fosfatidiletanol e impidiendo de esta manera la subsiguiente reacción de la PAP2 para formar DAG. Por otra parte el DL-Propranolol a 1,5 mM es conocido por ser un inhibidor de la PAP2 (Sciorra y Morris, 1999).

El enfoque para determinar si la insulina actuaba a través de la activación de la vía PC-PLD/PAP2 fue emplear estos inhibidores de manera de impedir la generación de DAG como sustrato de la DAGK.

Observamos en la figura 31 que la insulina no ejerce efecto estimulador en la formación de PA en presencia de etanol, siendo los valores similares a los obtenidos en los controles (ausencia de la insulina) con etanol. También se observa que el etanol produce una disminución en la formación de PA de un 50% con respecto al control sin el alcohol, indicando posiblemente, que la actividad de la PLD se encuentra *up-stream* a la actividad de la DAGK en los sinaptosomas de la CC.

También se observa en la Fig. 31, que el DL-Propranolol, produce una fuerte inhibición en la actividad basal de la DAGK (70 %), que no es revertida por la acción de la insulina. Esto podría indicar que la droga disminuye el sustrato DAG o que inhibe a la DAGK.



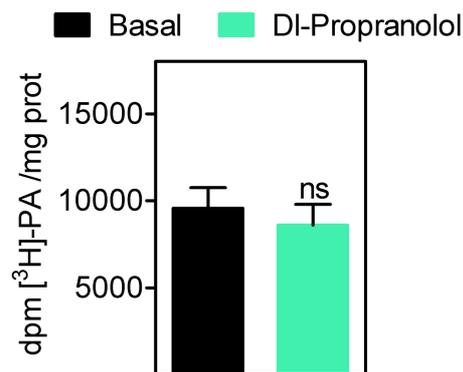
**Fig. 31- Efecto del etanol y del DL-Propranolol en la activación de la DAGK por acción de la insulina**

El ensayo se realizó preincubando las membranas sinaptosomales durante 10 min en ausencia ó en presencia de etanol al 2% ó DL-Propranolol 1,5 mM disuelto en DMSO para una concentración final del detergente del 0.1%. El tiempo de reacción fue medido a partir del agregado de 100  $\mu$ M de ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ , 3  $\mu$ Ci por muestra, seguido de 15 segundos de sonicación e inmediato agregado de la insulina o de la BSA en el caso de los basales. El ensayo se realizó a 37°C durante 5 min.

Cada condición se ensayó por triplicado. Los resultados expresan el porcentaje de PA formado por mg proteína x 5 min respecto al valor del control-basal (100%)  $\pm$  SD. \*\*p < 0.002, \*\*\*p < 0.0001, comparando cada condición vs. control-basal.

Para determinar si el DL-Propranolol tiene algún efecto inhibitorio en la actividad de la DAGK, se realizó un experimento en presencia de DAG exógeno radiactivo.

Como podemos observar en la Fig. 32, el DL-Propranolol no afecta directamente la actividad de la DAGK ya que no se observan diferencias significativas en la formación de PA- $[\text{}^3\text{H}]$ . Este resultado sugiere que el efecto inhibitorio que ejerce la droga a nivel basal (en ausencia de la insulina), podría atribuirse a la disminución de un aporte de DAG proveniente de la actividad PAP.



**Fig. 32- Efecto del DL-Propranolol sobre la actividad de la DAGK**

Se utilizó 45  $\mu\text{M}$  de DAG- $[\text{}^3\text{H}]$  proveniente de retina, de AE= 1100 dpm/nmol. El ensayo se realizó preincubando las membranas sinaptosomales durante 10 min en presencia ó en ausencia del inhibidor, siendo el tiempo de reacción medido a partir del agregado de 2 mM de ATP, seguido de 15 segundos de sonicación e inmediato agregado del DAG- $[\text{}^3\text{H}]$ .

Cada condición se ensayó por triplicado.

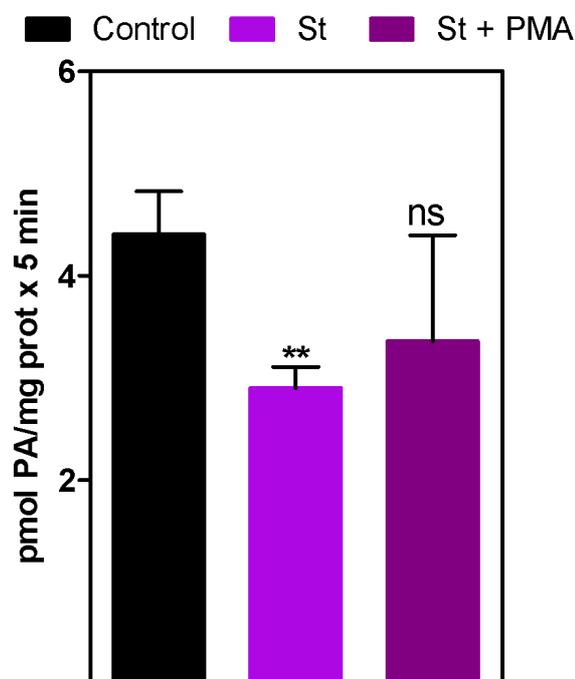
#### 7.4.2.1 - La formación de PA es modificada por la activación de PKC

Se sabe que la PKC $\alpha$  está implicada en la regulación de la PLD en respuesta a señales mitogénicas (Hornia y col., 1999; Yeo y Exton, 1995). La activación de la PLD por la PKC $\alpha$ , es regulada por fosforilación y por interacciones proteína-proteína (Oka y col., 2002). Entonces, basándonos en la potente inhibición de la DAGK cuando se emplean inhibidores de la PLD o de la PAP2, se podría especular que la generación de DAG a partir de la vía PLD/PAP2, está a su vez regulada por una activación de PKC.

En una primera aproximación se evaluó la modulación de la actividad DAGK, mediante la inhibición o activación de la fosforilación de proteínas mediada por PKC.

Se utilizó 1  $\mu\text{M}$  de PMA (*Phorbol 12-myristate 13-acetate*) como activador del grupo A y B de PKC (aquellas que requieren DAG para su activación) y 0,5  $\mu\text{M}$  de Staurosporina (St), como inhibidor de PKC.

En la Fig. 33 podemos observar una inhibición en la formación de PA cuando previamente en las membranas se inhibe la fosforilación mediada por PKC (en presencia de St), que se revierte parcialmente cuando la medida de la actividad DAGK se realiza en presencia de PMA, indicando que la activación de PKC podría estar involucrada en la actividad basal de la DAGK sinaptosomal.

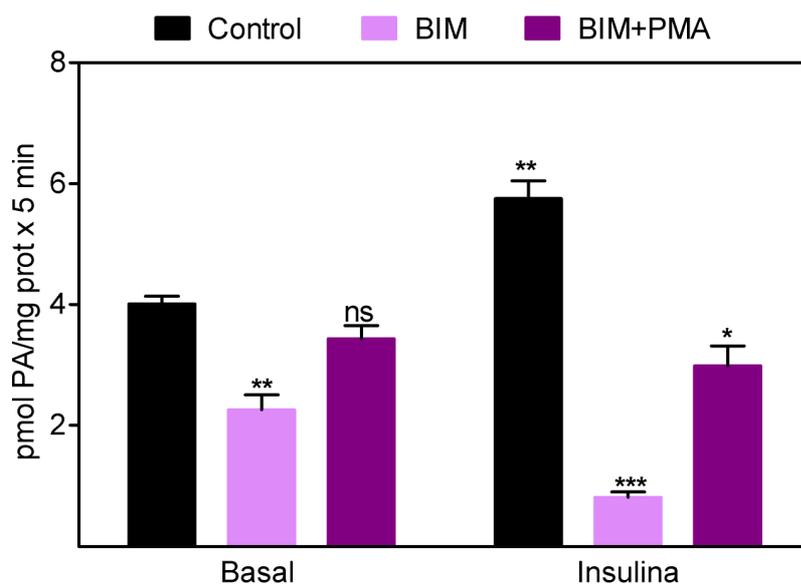


**Fig. 33- Acción de PKC en la actividad basal de la DAGK**

Los ensayos se realizaron en condiciones favorables para evaluar la acción de PKC, empleando el *buffer* de fosforilación HBM descrito en “Materiales y Métodos” apartado 6.5 y en presencia de 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{CaCl}_2$  y 12,5  $\mu\text{M}$  de fosfatidilserina (PS). El ensayo se realizó preincubando las membranas sinaptosomales durante 10 min en ausencia ó en presencia de 0,5  $\mu\text{M}$  de Staurosporina (St) disuelto en DMSO para una concentración final del detergente del 0.1%. El tiempo de reacción fue medido a partir del agregado de 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{ATP-}[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ , 3  $\mu\text{Ci}$  por muestra, seguido de 15 segundos de sonicación e inmediato agregado de 1  $\mu\text{M}$  de 12-myristate 13-acetate (PMA) o su vehículo. El ensayo se realizó a 37°C durante 5 min.

Cada condición se ensayó por triplicado. \*\*p < 0.002, comparando cada condición vs. control.

Sin embargo, surgieron al menos dos interrogantes: 1) si éste efecto mediado por PKC, también se puede observar en las condiciones normalmente utilizadas para el ensayo de la DAGK, con el *buffer* para la DAGK y la PS de membrana y 2) si éste efecto mediado por PKC está también ligado a la activación de la DAGK por la insulina. Se realizó un nuevo ensayo con el *buffer* que usualmente empleamos para la medida de actividad de la DAGK (Materiales y Métodos” apartado 6.5), utilizando en ésta oportunidad, otro inhibidor para la PKC ampliamente conocido, la bis-indolmaleimida (BIM).



**Fig. 34- Acción de PKC en la actividad de la DAGK en presencia y ausencia de la insulina**

El ensayo se realizó en presencia de 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{CaCl}_2$ , preincubando las membranas sinaptosomales durante 10 min en ausencia ó en presencia de BIM 5,8  $\mu\text{M}$  y en ausencia ó en presencia de PMA 1  $\mu\text{M}$ , disueltos en DMSO (concentración final 0,1% v/v). El tiempo de reacción fue medido a partir del agregado de 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{ATP-}[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ , 3  $\mu\text{Ci}$  por muestra, seguido de 15 segundos de sonicación e inmediato agregado de la insulina ó de la BSA en el caso de los basales. El ensayo se realizó a 37°C durante 5 min.

Cada condición se ensayó por triplicado. \* $p < 0.04$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.0001$  comparando cada condición vs. Control-Basal.

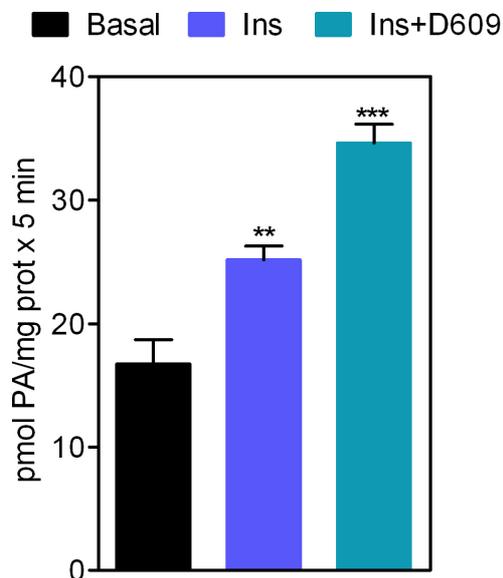
En las condiciones para el ensayo de la DAGK, también se puede observar una actividad de la DAGK que es dependiente de la actividad de PKC (Fig. 34). Llamativamente, el estímulo de insulina es inhibido en un 86 % en presencia de BIM mientras que en presencia de PMA, la inhibición por efecto del BIM, se revierte en un 52 %. Estos resultados, junto a lo observado con los inhibidores de la PC-PLD (Fig. 31) indican que la acción de la insulina provoca un aumento en la formación de PA, debido a un aumento en los niveles de DAG endógeno a partir del estímulo en la hidrólisis de PC por la vía PC-PLD/PAP2 y posiblemente relacionada esta activación a la activación de una PKC.

#### **7.4.3 - La vía PC-PLC no participa en la activación de la DAGK por efecto de la insulina.**

En nuestro grupo de trabajo se ha demostrado en terminales sinápticos de CC la presencia de la PC-PLC, enzima que cataliza la hidrólisis de la PC produciendo DAG. La formación de DAG proveniente de la vía PC-PLC y PC-PLD, representa un 75% y un 25% del total de DAG proveniente de la hidrólisis de PC, respectivamente (Mateos y col., 2006). Para evaluar la participación de ésta vía en la activación de la DAGK por la insulina, se realizaron experimentos en presencia del inhibidor específico de la PC-PLC, la sal de potasio Triciclodecán-9-il-xantato (D609). Lo esperable, en caso de que la vía fuera activada por la insulina, era que el estímulo en la formación de PA fuera parcialmente bloqueado.

Las condiciones del ensayo, fueron similares a los casos anteriores, pero debido a que la droga es tóxica en medios que contienen como solución tampón al HEPES, el ensayo se realizó utilizando Tris-Maleato 50 mM. El pH

también fue modificado, debido a que un pH ligeramente alcalino inestabiliza a la droga, por tal motivo el pH del ensayo fue de 6,5.



**Fig. 35- Efecto del inhibidor para PC-PLC en la activación de la DAGK por la insulina**

El ensayo se realizó preincubando las membranas sinaptosomales durante 10 min en ausencia ó en presencia de 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de D609 en DMSO (0,1%). El tiempo de reacción fue medido a partir del agregado de 200  $\mu\text{M}$  de ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ , seguido de 15 segundos de sonicación e inmediato agregado de la insulina o de la BSA en el caso del basal. El ensayo se realizó a 37°C durante 5 min.

Cada condición se ensayó por triplicado. \*\*p < 0.005, \*\*\*p < 0.0006 comparando cada condición vs. Basal.

El D609 no disminuye la activación de la DAGK por la hormona, como se puede observar en la Fig. 35, indicando que la vía PC-PLC no está involucrada en el mecanismo de activación de la DAGK por la insulina a través de la generación del sustrato DAG. En ésta figura también se observa que el estímulo que ejerce la insulina en la formación de PA es superior si está presente el inhibidor de PC-PLC. Este resultado podría indicar que el bloqueo de la vía de hidrólisis de PC por PLC, aumenta la disponibilidad de PC para su degradación por la PLD.

### **7.5 - La insulina estimula la actividad de la DAGK en forma independiente de la formación de DAG en la membrana**

El incremento en la formación de PA por estímulo de la DAGK, acción ejercida por la insulina, no se debe sólo al incremento en la masa de DAG por acción de la hormona sobre enzimas generadoras de DAG, sino que también se produce una activación directa sobre la enzima, hallazgo observado en la Fig. 25.

Hemos detectado que en nuestras condiciones de ensayo, la hormona activa la fosfolipasa tipo C sobre los fosfoinosítidos (Fig. 28, 29 y 30) y la fosfolipasa D actuante sobre PC (Fig. 31). Esto genera DAGs de diferente composición. Nos preguntamos entonces si este efecto independiente del incremento en la producción de sustrato lipídico:

- 1) es selectivo para un tipo de DAG, más saturado en composición de acilos (p. ej. relacionado a PC) ó mas insaturado y rico en araquidonato en la posición 2 (proveniente de los fosfoinosítidos).
- 2) cual sería el posible mecanismo de activación de la DAGK por la insulina, independiente de la formación de DAG en la membrana?

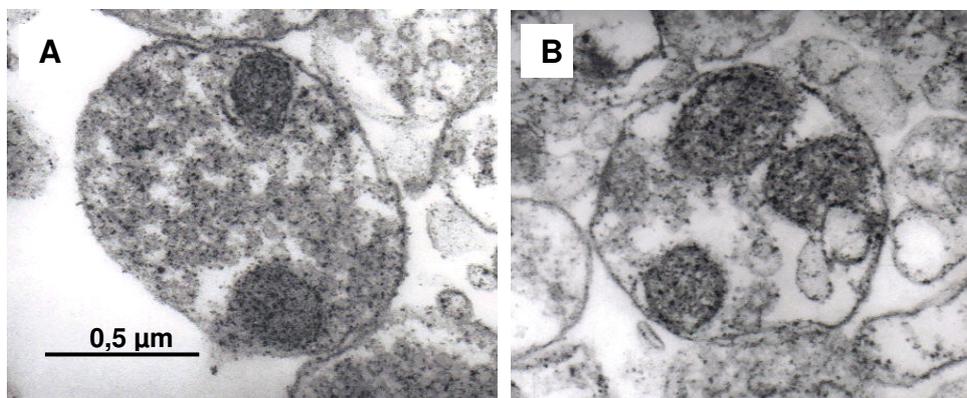
Para evaluar la acción de la insulina, independizándonos del incremento en la concentración de DAG, la estrategia desarrollada fue la medición de la actividad DAGK utilizando sustrato exógeno de diferente composición.

Para llevar a cabo este estudio debíamos asegurar la integridad sinaptosomal dado que el lípido es ofertado en micelas mixtas con detergente. Nuestros datos previos (Capítulo I) indicaron una importante actividad de DAGK actuando sobre el sustrato SAG y utilizando OG como detergente. Por datos bibliográficos donde se estudió la acción de diversas hormonas en células en cultivo, conocíamos la utilización de dimetilsulfóxido

para vehicular drogas hidrofóbicas ó lípidos sin producir efectos deletéreos en la estructura celular.

Por esta razón realizamos diversos controles sobre la integridad sinaptosomal y sobre la eficiencia de incorporación del lípido al sinaptosoma. A partir de estos datos, aunque OG es el detergente de elección para medir la actividad enzimática, utilizamos DMSO como vehículo para dispersar al DAG.

Los controles de la integridad sinaptosomal se evaluaron por microscopía electrónica de transmisión (TEM), en presencia y ausencia del DMSO, realizando además, los 15 segundos de sonicación habituales que tienen lugar en los ensayos, tal como de detalla en Materiales y Métodos, Fig. 8 del apartado 6.5.3.1.



**Fig. 36- Fotografía de sinaptosomas obtenidas por TEM**

Las fotografías son adquiridas con un aumento de 67.000 X.

- A) Tratamiento con BE
- B) Tratamiento con 0,1% v/v de DMSO

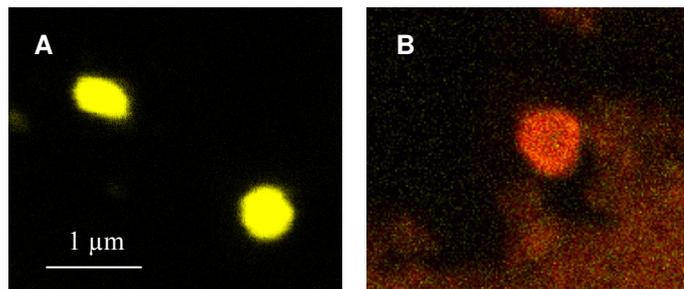
Como podemos observar, el tratamiento de las membranas sinaptosomales con el detergente y posterior sonicado, no modifica su estructura, ni el tamaño sinaptosomal. Se advierte asimismo la similitud en cuanto al contenido de subestructuras intrasinaptosomales, como mitocondrias, como

también del contenido de vesículas sinápticas y retículo endoplásmico. El tratamiento de los sinaptosomas con micelas de DPG-DMSO ó SAG-DMSO arrojó resultados similares al tratamiento con DMSO. Sin embargo este estudio no nos permite evaluar la incorporación efectiva del DAG al sinaptosoma.

Para evaluar la eficiencia de incorporación de los lípidos contenidos en las micelas a los sinaptosomas, se utilizó el colorante rojo nilo (9-dietilamino-5H-benzo [ $\alpha$ ] fenoxazina-5-ona), como marcador de lípidos, tal como se indicó en Materiales y Métodos, apartado 6.5.3.2. El rojo nilo (RN) es comúnmente utilizado para la detección y visualización de gotas intracelulares de lípidos neutros (Greenspan y Fowler, 1985; Greenspan y col., 1985). Los lípidos neutros fluorescen de un color brillante amarillo-oro, cuando son marcados con el colorante y observados por microscopia de fluorescencia usando un filtro apropiado (longitud de onda 450-500 nanómetro). En cambio, la interacción entre los fosfolípidos y el RN provoca una coloración fluorescente anaranjada.

Los sinaptosomas marcados con el colorante RN se evaluaron por microscopía de fluorescencia en presencia de las micelas formadas por la mezcla de lípido-DMSO y en presencia sólo del detergente como control. Como podemos observar en la Fig. 37, los sinaptosomas tratados con las micelas de DAG-DMSO (panel A) muestran una fluorescencia amarilla, mientras que los tratados sólo con el DMSO (panel B) muestran una fluorescencia roja, típica de los fosfolípidos de la membrana.

Estos resultados permiten demostrar que el tratamiento de los sinaptosomas con las micelas de lípido-DMSO, no afecta la estructura sinaptosomal, incorporando eficientemente el lípido al mismo.



**Fig. 37- Fotografía de sinaptosomas obtenidas por microscopía de fluorescencia (MF)**

Las fotografías son adquiridas utilizando un filtro de 450-500 nm de longitud de onda. La concentración de DAG fue de 250  $\mu$ M y la de DMSO de 0,1% v/v.

- (A) Sinaptosomas tratados con micelas de DAG-DMSO
- (B) Sinaptosomas tratados con DMSO

Para continuar con el estudio de la acción de la insulina sobre la actividad de la DAGK, independientemente de la formación de DAG en la membrana, inicialmente se evaluó la actividad de la DAGK utilizando DAGs exógenos de diferente composición, a una concentración de 250  $\mu$ M de DAG (diez veces superior a la concentración endógena).

Como podemos observar en la Tabla IV, el sustrato exógeno, incrementa la formación de PA con respecto a los valores obtenidos en donde se utilizó el DAG endógeno sinaptosomal. En los ensayos con OG, la formación de PA a partir de SAG fue 17 veces superior que a partir del DAG endógeno y el PA generado a partir de DPG sólo fue 2,4 veces superior.

Como se mencionó anteriormente, el OG es el detergente ideal para evaluar las isoformas de DAGK de membrana entre ellas la selectiva del sustrato SAG (Walsh y col., 1994). Sin embargo, en los ensayos con DMSO, también se observó la preferencia en la utilización de SAG con respecto a la de DPG, aunque el aumento es de 1 y 7 veces para DPG y SAG respectivamente.

Condiciones	Ensayo con 50 mM de OG		Ensayo con 0,1% de DMSO	
	%	SD	%	SD
<b>Basal</b>	100	8,88	100	3,05
<b>DPG</b>	341	38,74	209	35,71
<b>SAG</b>	1818	108,26	800	185,98

**Tabla IV- Actividad de la DAGK en presencia de sustrato exógeno de diferente composición en micelas de detergentes**

La concentración de DAG utilizada fue de 250  $\mu$ M. Los mismos fueron ofertados en micelas de detergentes (DMSO ú OG en una concentración final de 0.1% v/v y 50 mM respectivamente). Se utilizó como DAG exógeno, 1,2-dipalmitoilglicerol (DPG) y 1-estearoil, 2-araquidonoilglicerol (SAG) en presencia de 500  $\mu$ M de ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ , 3  $\mu$ Ci por muestra. El tiempo de reacción fue medido a partir del agregado del ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ , seguido de 15 segundos de sonicado. El ensayo se realizó a 37°C y el tiempo de incubación fue de 5 min.

Como se demostró en la Fig. 19, la transformación preferencial de SAG, medida en 250  $\mu$ M de ATP, también ocurre a concentraciones saturantes de diacilglicéridos saturados ó poliinsaturados (DPG y SAG). Por lo tanto, la diferencia en la preferencia por sustrato poliinsaturado no se debe a una diferente “saturabilidad” para DPG ó SAG. Resulta evidente de esos resultados que 250  $\mu$ M de DAG y 500  $\mu$ M de ATP, no serían concentraciones saturantes para DPG.

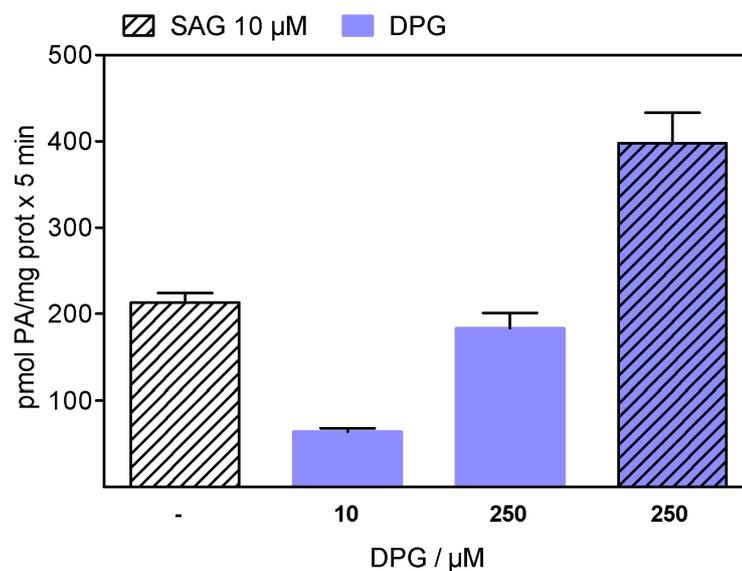
En estos ensayos con OG y en presencia de DAG exógeno, la DAGK de sinaptosomas de CC utiliza preferencialmente el SAG. Como se muestra en la Tabla IV, esta situación se mantiene cuando el sustrato es ofertado en DMSO, vehículo empleado en las experiencias donde se evaluó la acción de insulina en terminales sinápticos.

El DAG enriquecido en ácido araquidónico, 20:4-DAG, aumenta durante el estímulo de la PI-PLC y rápidamente es fosforilado a PA por la DAGK. El 20:4-PA es el sustrato preferido por al menos una de la isoformas de la CDP-DAG sintetasa (CDS) (Saito y col., 1997), generando CDP-DAG (o CMP-PA) el cual es utilizado por la fosfatidilinositol sintetasa para la síntesis de fosfatidilinositol (Lykidis y col., 1997). Luego, a partir de fosforilaciones secuenciales, se regenera el PIP<sub>2</sub>. El sitio donde ocurre la formación de PI es el retículo endoplásmico y ha sido objeto de numerosos estudios la resíntesis de polifosfoinosítidos, ya que existe un necesario proceso de transporte que sería mediado por proteínas transportadoras de PI hacia la membrana plasmática donde se encuentran las quinasas de fosfoinosítidos. La síntesis de novo de PA, con participación de las acil transferasas sobre glicerol 3 fosfato, también ocurre en retículo endoplásmico. En cuanto a la utilización de un PA formado a partir de un DAG producido en la membrana plasmática como consecuencia de la activación de fosfolipasas, se sugiere que también ocurre en retículo pero no es consecuencia de un transporte mediado por proteínas sino por un proceso de migración de vesículas (Cockcroft y Thomas, 1992).

De las 10 isoformas hasta el momento conocidas, sólo la DAGK $\epsilon$  muestra preferencia en la utilización del DAG, reaccionando más eficientemente en presencia de 20:4-DAG (Luo y col., 2004). Tanto la DAGK $\epsilon$  (Walsh y col., 1995), como la CDS (Saito y col., 1997), son inhibidas por PIP<sub>2</sub>, mostrando un mecanismo de regulación negativa en la síntesis de fosfoinosítidos. La hipotética participación de la DAGK $\epsilon$  en el inicio de la resíntesis de fosfoinosítidos a partir de un PA conteniendo 20:4, es avalada también por su localización subcelular ya que predomina en el retículo endoplásmico.

**7.5.1 - El SAG no es un regulador positivo para isoformas de DAGK no selectivas de sustrato.**

En base a que en nuestras preparaciones sinaptosomales observábamos una eficiente utilización de SAG para formar PA podíamos suponer que estábamos detectando preferentemente, por las condiciones de nuestro ensayo, a una actividad DAGK $\epsilon$ . Sin embargo, también se podría especular que ésta actividad preferencial de DAGK sobre los SAG, se debe a que el SAG podría estar actuando como regulador positivo en las isoformas de la DAGK no selectivas de sustrato. Para probar ésta posibilidad, se realizó un ensayo midiendo la formación de PA a partir de 10  $\mu$ M de SAG y en presencia o ausencia de 250  $\mu$ M de DPG.



**Fig. 38- Estudio del efecto del SAG como regulador de la actividad DAGK actuante sobre DPG**

Los lípidos DPG y SAG fueron ofertados en micelas de OG (50 mM del detergente). Se midió la formación de PA a partir de 10  $\mu$ M de SAG en presencia o ausencia de 250  $\mu$ M de DPG. Los controles se realizaron midiendo la actividad en presencia de 10 o 250  $\mu$ M de DPG y en ausencia de SAG. El tiempo de reacción fue medido a partir del agregado de 100  $\mu$ M de ATP- $[\gamma$ - $^{32}$ P] (3 $\mu$ Ci/muestra), seguido de 15 segundos de sonicación. El ensayo se realizó a 37°C durante 5 min.

Como muestra la Fig. 38, la formación de PA con 250  $\mu$ M de DPG fue dos veces superior que con 10  $\mu$ M de DPG. Por otra parte y tal como se había observado, el empleo de 10  $\mu$ M de SAG produjo una importante formación de PA, equivalente a 250  $\mu$ M de DPG. Cuando 10  $\mu$ M de SAG se agregó a los 250  $\mu$ M de DPG, la formación de PA no se potenció y solo se observó una síntesis equivalente a la sumatoria de ambos aportes.

### **7.5.2 - La formación de PA a partir de SAG o DPG, no es afectada por el R59022 y el R59949, inhibidores de la DAGK**

Se conocen dos inhibidores para la DAGK, el 6-(2-(4-[(4-fluorofenil)fenilmetileno]-1-piperidinil)etil)-7-metil-5H-tiazol(3,2-a)pirimidin-5-ona (R59022) y el 3-[2-(4-[bis-(4-fluorofenil)metileno]-1-piperidinil)etil]-2,3-dihidro-2-tioxo-4(1H)quinazolinona (R59949) (Jiang y col., 2000). La acción del R59949 es selectiva para aquellas isoformas dependientes de calcio (tipo I), mientras que las isoformas insensibles al calcio, son mínimamente afectadas por éste agente. Ha sido reportado también, que la presencia de MgATP por encima de 0,2 mM, acentúan la inhibición por el R59949 sobre las isoformas calcio-dependientes. Tanto el R59949 como el R59022, son incapaces de inhibir a la DAGK específica para 20:4-DAG extraída de testículo (Jiang y col., 2000).

Se realizaron experimentos para evaluar si la presencia de estos agentes (R59022 y R59949) afecta la actividad DAGK actuante sobre los DAG exógenos.

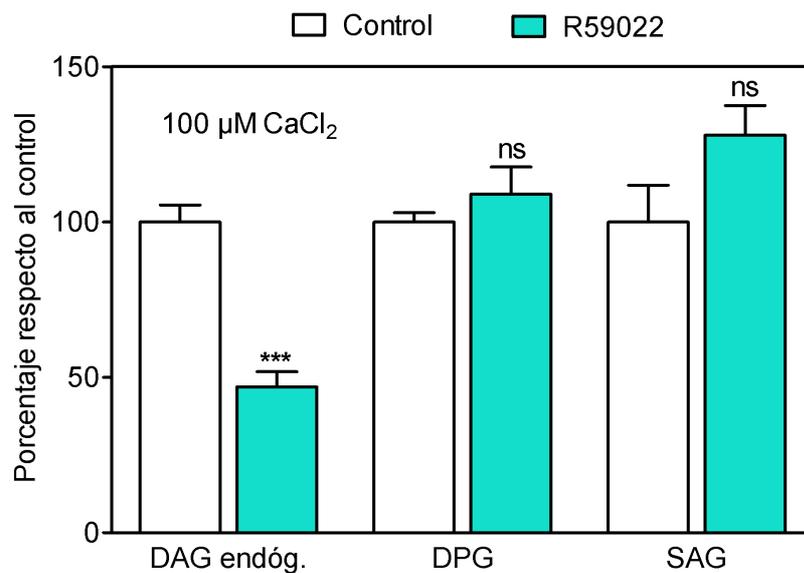
Aunque, como se muestra en la Tabla IV, la utilización preferencial de SAG se observa mejor en los ensayos con OG, estos ensayos se realizaron en presencia de DMSO (conc. final de 0,1 %), ya que ambos inhibidores son muy poco solubles en OG y en cambio son solubles en DMSO (Jiang y col.,

2000). Las membranas sinaptosomales fueron preincubadas en presencia o ausencia de los inhibidores durante 10 min. La presencia previa del inhibidor (preincubación durante 10 min) aseguraría que, aún suponiendo una acción competitiva, el DAG exógeno tiene menores posibilidades para desplazar, en los 5 min subsiguientes, al inhibidor. Por otra parte, datos recientes sobre los efectos del R59022 sobre la DAGK de fracciones subcelulares de vena porta, ensayada con SAG en 73 mM de OG, indican que 3  $\mu$ M de este agente es capaz de inhibirla en un 60 % (Nobe y col., 2004).

La figura 39 muestra los efectos del inhibidor R59022 en la formación de PA a partir de DAG endógeno ó DAGs exógenos (DPG y SAG) en presencia de 100  $\mu$ M de  $\text{CaCl}_2$ . Aunque el R59022 es capaz de inhibir en un 53 % la formación de PA a partir del DAG endógeno, el agente no ejerce efecto inhibitorio sobre la formación de PA a partir de SAG o DPG.

La ausencia de acción del inhibidor cuando se mide la DAGK actuante sobre DAGs exógenos, fue también comprobada cuando se empleó al R59949 (Fig. 40).

Estos resultados indican que la actividad de la DAGK actuante sobre DAGs exógenos y medida en los sinaptosomas de CC: 1) es activada por OG, 2) es insensible al R59022 y 3) preferencialmente utiliza el SAG como sustrato.



**Fig. 39- Efecto del R59022 en la formación de PA**

Se utilizó 250 μM de DAG (SAG y DPG) en micelas de DMSO (0,1% v/v del detergente). El ensayo se realizó preincubando las membranas sinaptosomales durante 10 min en ausencia ó en presencia de 10 μM de R59022. El tiempo de reacción fue medido a partir del agregado de 500 μM de ATP-[γ-<sup>32</sup>P] + DAG, seguido de 15 segundos de sonicación. El ensayo se realizó a 37°C durante 5 min.

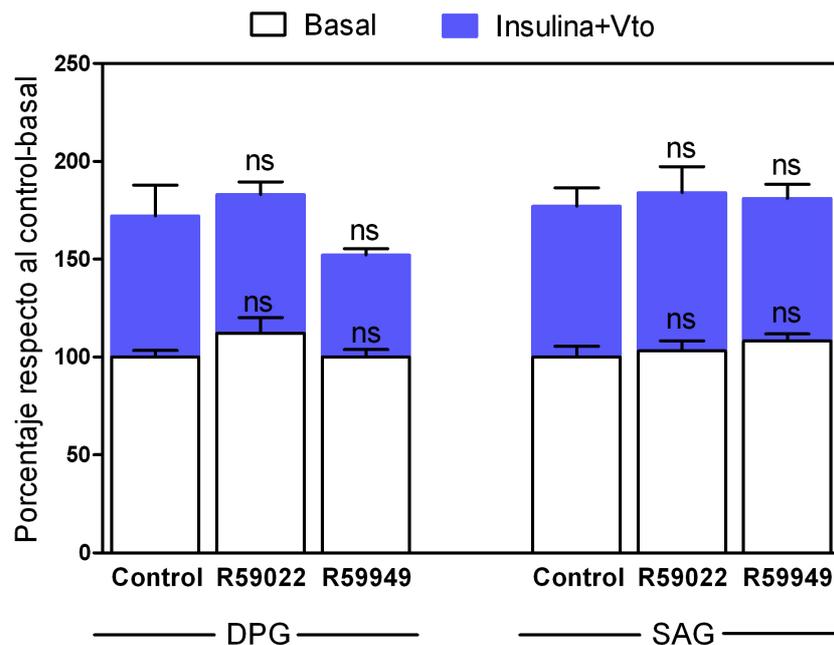
Cada condición se ensayó por triplicado. Los resultados expresan el porcentaje de PA formado por mg proteína x 5 min respecto al valor del control (100%) ± SD. \*\*\*p < 0.0002 comparando R59022 vs. Control para cada lípido ensayado.

## 7.6 - Acción de la insulina sobre la actividad de la DAGK sinaptosomal, actuante sobre DPG o SAG.

### 7.6.1 - Efecto de los inhibidores R59022 y R59949.

Para evaluar el efecto de la insulina sobre la formación de PA a partir de DAGs exógenos se utilizó 250 μM de DAG (SAG y DPG) en presencia de 10 μM de R59022 a 500 μM de ATP y 240 nM de R59949 a 4 mM de ATP. Tal como se mencionó previamente, la mayor concentración de ATP-Mg mejora la capacidad inhibitoria del R59949. En las condiciones en presencia de la

insulina, también se encuentra presente 200  $\mu\text{M}$  de o-vanadato (Vto), a fin de inhibir la desfosforilación de proteínas fosforiladas en tirosina (tirosinafosfatasa) manteniendo de este modo, el efecto tirosina-quinasa de la insulina.



**Fig. 40- Efecto del R59022 y del R59949 en la formación de PA. Efecto de Insulina + Vanadato**

Se utilizaron 250  $\mu\text{M}$  de DPG o SAG como sustratos lipídicos y 10  $\mu\text{M}$  de R59022 a 500  $\mu\text{M}$  de ATP ó 240 nM de R59949 a 4 mM de ATP. Se utilizó DMSO (conc. final 0,1% v/v) para solubilizar los lípidos o inhibidores. El ensayo se realizó preincubando las membranas sinaptosomales durante 10 min en ausencia ó en presencia de los inhibidores. El tiempo de reacción fue medido a partir del agregado de ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  + DAG, seguido de 15 segundos de sonicación e inmediato agregado de la insulina (200 nM) ó de la BSA en el caso de los basales. Las condiciones con insulina se realizaron en presencia de 200  $\mu\text{M}$  de o-vanadato. El ensayo se realizó en a 37°C durante 5 min.

Cada condición se ensayó por triplicado. Los resultados expresan el porcentaje de PA formado por mg proteína x 5 min respecto al valor del control-basal para cada sustrato lipídico (100%)  $\pm$  SD. Se compara cada condición experimental frente a su control respectivo (basal ó en presencia de Insulina + Vto), para cada lípido ensayado.

Como se observa en la Fig. 40, barras blancas, en ausencia de insulina no se modifica la actividad DAGK sobre DPG o SAG, con ninguno de los dos inhibidores. También se observa que el estímulo en la formación de PA por acción de la insulina a partir del SAG o DPG, es similar en ambos casos y tampoco se modifica por el agregado del R59022 o del R59949. Para representar esta situación se utilizaron los porcentajes respecto a cada control. Sin embargo, desde el punto de vista cuantitativo y tal como hemos mostrado previamente, el SAG es el sustrato mas eficientemente utilizado por los sinaptosomas de CC.

Estos resultados indican que el efecto que ejerce la insulina no modifica la actividad de la DAGK actuante sobre DAGs exógenos desde el punto de vista de su sensibilidad a inhibidores.

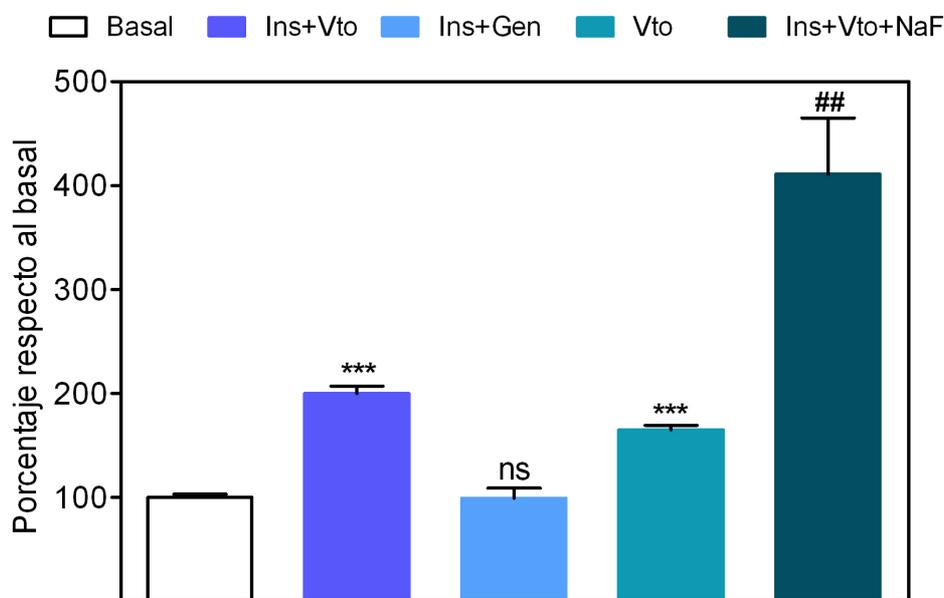
Para conocer cual es el mecanismo de activación de la DAGK, independiente del aumento de DAG en la membrana por acción de fosfolipasas, evaluamos la acción de la insulina utilizando diferentes reguladores.

#### **7.6.2 - La insulina estimula la síntesis de PA en forma dependiente de la fosforilación en tirosina**

La actividad tirosina-quinasa del receptor de la insulina (RI) es esencial, en algunos tipos celulares, para responder al efecto de la insulina. Para evaluar la participación del RI en la activación de la DAGK por la hormona, se realizaron experimentos en presencia de genisteína (Gen), un inhibidor de proteínas tirosina-quinasas (Akiyama y Ogawara, 1991) y orto-vanadato (Vto) como inhibidor de proteínas tirosina-fosfatasas (Akiyama y Ogawara, 1991; Swarup y col., 1982).

Cabe destacar que en los ensayos realizados para evaluar la actividad de la DAGK, como también en otros ensayos de fosforilación, habitualmente el

*buffer* de ensayo contenía 10-20 mM de fluoruro de sodio (NaF), como inhibidor general de proteínas fosfatasas (Shenolikar y Nairn, 1991). Sin embargo, ha sido reportado que el NaF causa la inhibición casi total de la autofosforilación y de la actividad tirosina-quinasa del RI y del receptor para el factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I receptor) (Vinals y col., 1997). Por tal motivo los ensayos fueron modificados, midiendo el efecto de la insulina sobre la actividad de la DAGK, en presencia y en ausencia de 20 mM de NaF en el medio de incubación.



**Fig. 41- Acción de reguladores de la fosforilación en tirosina sobre la formación de PA a partir de SAG. Efecto del NaF**

El ensayo se realizó en presencia de 250  $\mu$ M de SAG en DMSO (0,1%) y 200  $\mu$ M de ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ , 3  $\mu$ Ci/muestra. La concentración utilizada de insulina (Ins), vanadato (Vto), genisteína (Gen) y NaF fue de 200 nM, 200  $\mu$ M, 50  $\mu$ M y 20 mM respectivamente. El tiempo de reacción fue medido a partir del agregado de las membranas sinaptosomales, seguido de 15 segundos de sonicación e inmediato agregado de la insulina o de la BSA en el caso del basal. El ensayo se realizó a 37°C y el tiempo de incubación fue de 5 min.

Cada condición se ensayó por triplicado. Los resultados expresan el porcentaje de PA formado por mg proteína x 5 min respecto al valor basal (100%)  $\pm$  SD. \*\*\*p < 0.0001 comparando experimental vs. Basal y ##p < 0.002 comparando Ins+Vto+NaF vs. Ins+Vto.

Como podemos observar en la Fig. 41, el incremento en la actividad de la DAGK por la insulina, es inhibido totalmente en presencia de la Gen. Este efecto permite evidenciar una activación de la DAGK por la insulina que es dependiente de la fosforilación en tirosina.

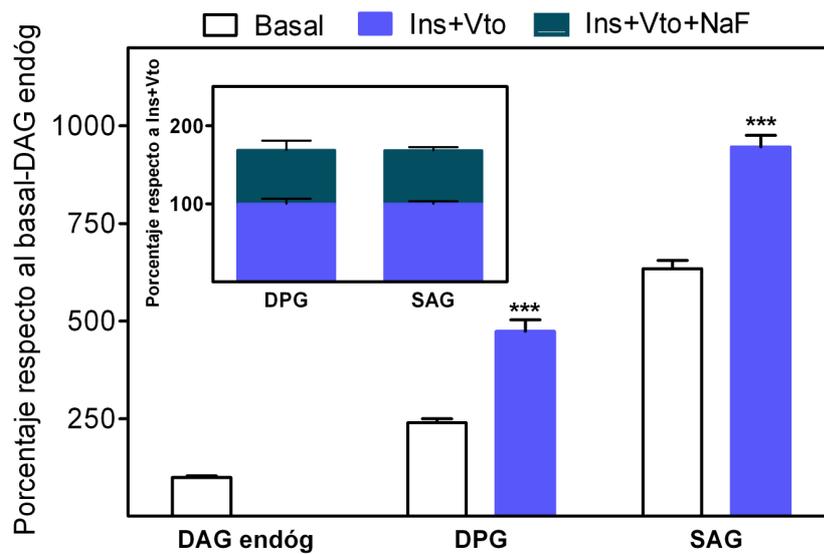
También podemos observar en el gráfico que el NaF incrementa una vez la formación de PA a partir de SAG, respecto al estímulo que ejerce la insulina en presencia del vanadato (Ins+Vto).

Ha sido reportado que el vanadato tiene efectos similares a la insulina, hecho que le ha valido su denominación como insulino-mimético (Shechter, 1990). Como se observa en la figura anterior, el vanadato sólo produce un efecto similar a la insulina sobre DAGK, sin embargo, en presencia de la insulina incrementa la acción hormonal.

Como se pudo observar, la actividad tirosina-quinasa del receptor de la insulina, es esencial para la respuesta hormonal asociada a la activación de la DAGK sobre sustratos exógenos. Por lo tanto, todos los estudios posteriores, para caracterizar el efecto de la insulina en la formación de PA por acción de la DAGK actuante sobre DAGs exógenos, se realizaron en presencia de 200  $\mu$ M de o-vanadato de sodio.

### **7.6.3 - La insulina estimula la síntesis de PA en forma independiente de la fosforilación en serina y treonina**

El NaF es un clásico inhibidor de Serina/Treonina (Ser/Treo) fosfatasas (Shenolikar y Nairn, 1991) y es rutinariamente incluido en los *buffers* de extracción para prevenir la desfosforilación de proteínas en residuos de Ser y Treo. Para profundizar sobre el efecto estimulador de NaF en la acción de la insulina, se realizaron otros ensayos experimentales comparando el efecto de NaF utilizando DPG o SAG como sustratos.



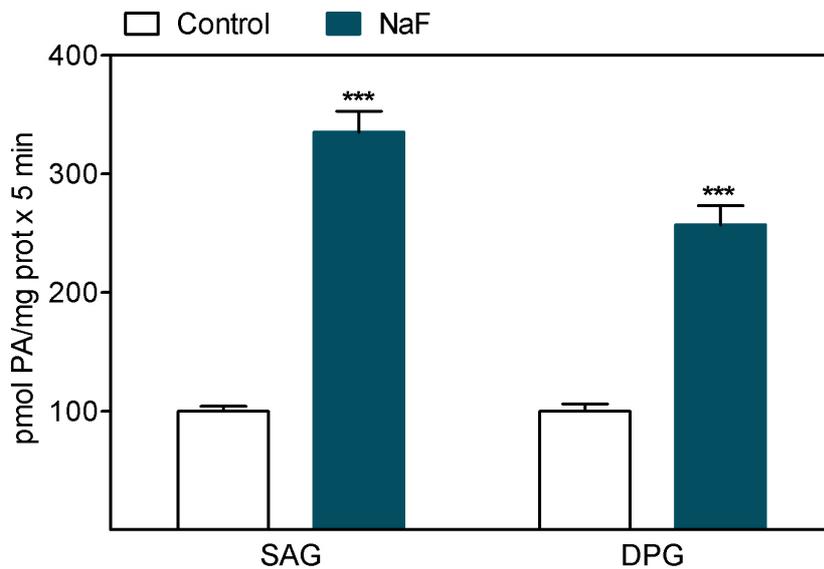
**Fig. 42- Efecto del NaF en la actividad DAGK a partir de DPG y SAG**

Se utilizaron como sustratos lipídicos al DAG endógeno y 250  $\mu\text{M}$  de DPG o SAG en presencia de 50 mM de OG y 500  $\mu\text{M}$  de ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ , 3  $\mu\text{Ci}$ /muestra. El ensayo se realizó en ausencia y presencia de 20 mM de NaF. El tiempo de reacción fue medido a partir del agregado de las membranas sinaptosomales, seguido de 15 segundos de sonicación e inmediato agregado de la insulina (200 nM) o de la BSA en el caso de los basales. El ensayo se realizó a 37°C y el tiempo de incubación fue de 5 min.

Cada condición se ensayó por triplicado. Los resultados expresan el porcentaje de PA formado por mg proteína x 5 min respecto al valor en presencia de DAG endóg. (100%) ó respecto al valor en presencia de DAG+Ins+Vto (100%) en el inserto  $\pm$  SD. \*\*\*p < 0.0001 comparando experimental vs. Basal para cada lípido ensayado.

Como podemos observar en la Fig. 42, donde los resultados se expresan como porcentaje respecto al PA sintetizado a partir de DAG endógeno (columna de la izquierda), la formación de PA a partir de SAG es muy superior a la obtenida a partir de DPG, tanto a nivel basal (sin el efecto de la insulina) como por estímulo de la hormona. Sin embargo, el efecto del NaF luego de la acción de la insulina, es similar para ambos sustratos utilizados, aumentando 0,5 veces el estímulo de la insulina en presencia de Vto. Estos resultados nos permiten mostrar que en presencia de NaF, la formación de PA a partir de SAG es 16 veces superior a los valores obtenidos a partir de DAG endógeno. Es interesante notar que en ausencia

del estímulo hormonal y en ausencia de vanadato, el NaF estimula la formación de PA a partir de SAG y de DPG en 2,35 y 1,57 veces respecto al control, respectivamente (Fig. 43).



**Fig. 43- Efecto del NaF en la actividad de la DAGK sobre SAG y DPG**

Se utilizaron 250  $\mu$ M de DPG o SAG en presencia de 50 mM de OG y 500  $\mu$ M de ATP- $[\gamma$ - $^{32}$ P], 3  $\mu$ Ci/muestra. El ensayo se realizó en ausencia y presencia de 20 mM de NaF. El tiempo de reacción fue medido a partir del agregado de las membranas sinaptosomales, seguido de 15 segundos de sonicación. El ensayo se realizó a 37°C y el tiempo de incubación fue de 5 min.

Cada condición se ensayó por triplicado. \*\*\* $p$  < 0.0001 para la condición NaF vs. su respectivo control.

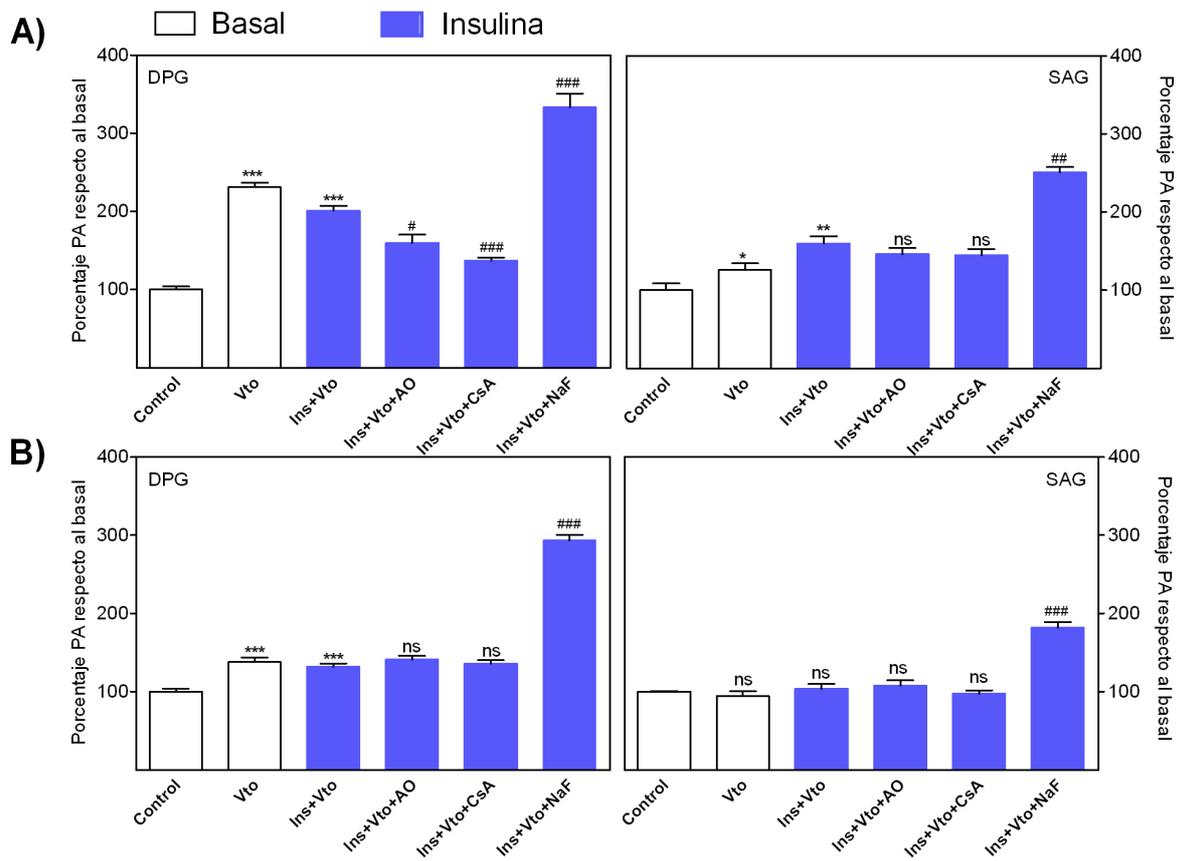
Para evaluar si el efecto del NaF se debe a que la inhibición de las Ser/Treo fosfatasas provoca una desregulación positiva en la actividad de la DAGK, se realizaron ensayos midiendo la formación de PA a partir de SAG y DPG, en presencia de inhibidores selectivos de las fosfatasas mencionadas. Para ello se utilizó 1  $\mu$ M de ácido okadaico (AO), como inhibidor de las fosfatasas PP1 y PP2A (Bialojan y col., 1988; Holmes y col., 1990) y 120 nM de ciclosporina A (CsA), como inhibidor de la fosfatasa PP2B o calcineurina

(Nichols y col., 1994; Clipstone y col., 1994). El efecto inhibitorio de éstos agentes es más evidente a bajas concentraciones de ATP, dado que la acción de las proteínas fosfatasas es efectiva y los controles estarán desfosforilados. Por esta razón, a fin de asegurar que la posible acción de las drogas sobre DAGK se debe a una inhibición de las fosfatasas, se realiza una experiencia en paralelo empleando una concentración elevada de ATP lo que asegura una mayor capacidad fosforilante y un control fosforilado. En esta condición, el efecto debido a la inhibición de fosfatasas debiera revertirse. El control fue realizado en ausencia de NaF y en ausencia de vanadato.

Como podemos observar en la Fig. 44A, la acción de AO y CsA no se corresponde con el estímulo ejercido por NaF en la síntesis de PA a partir de SAG y DPG cuando la concentración de ATP fue de 0,5 mM. Como era de esperar, los efectos de OA y CsA sobre DPG, no se observan a 4 mM de ATP (Fig. 44B). Sin embargo, el NaF incrementa fuertemente la síntesis de PA tanto a 0,5 como a 4 mM de ATP. Estos resultados sugieren que el efecto estimulador del NaF no está relacionado a la protección de la fosforilación de proteínas en los residuos Ser/Treo.

Se sabe que la PI3K que fosforila a los fosfolípidos de inositol en posición 3, es estimulada por la insulina en una gran variedad de tejidos sensibles a la hormona (Farese y col., 2005). Se podría especular que el NaF actuaría como inhibidor de aquellas Ser/Treo-fosfatasas que participan en la defosforilación de Akt, la que podría encontrarse fosforilada en éstos residuos por el mecanismo de transducción de la insulina, dependiente de la activación de PI3K y que podría encontrarse *upstream* a la activación de la DAGK por la hormona. Se realizaron entonces ensayos experimentales, en presencia y ausencia del inhibidor selectivo de la PI3K, el LY294002 (LY),

(Vlahos y col., 1994) y en presencia de Vto y de NaF en el medio de incubación.



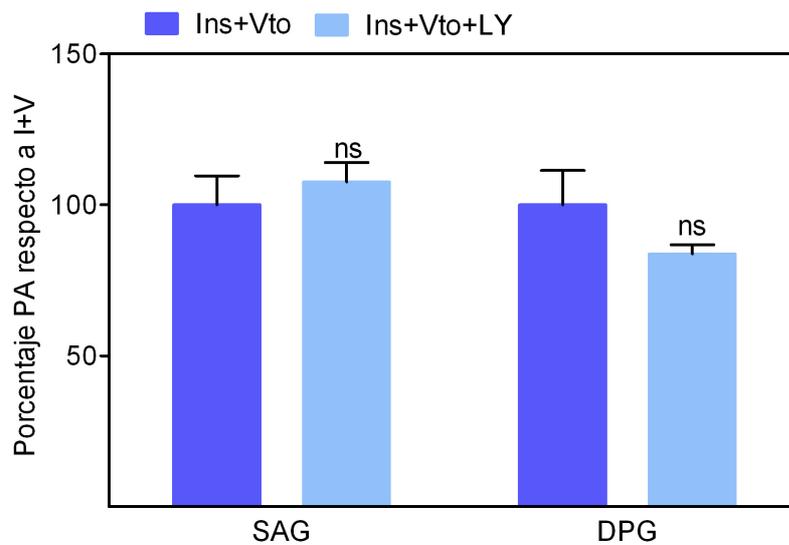
**Fig. 44- Efecto de los inhibidores de Ser/Treo fosfatasa**

Se utilizaron 250  $\mu$ M de DPG o SAG en presencia de 50 mM de OG y ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ , 3  $\mu$ Ci/muestra. La concentración utilizada de Ins, Vto, AO, CsA y NaF fue de 200 nM, 200  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 240 nM y 20 mM respectivamente. El tiempo de reacción fue medido a partir del agregado de las membranas sinaptosomales, seguido de 15 segundos de sonicación e inmediato agregado de la insulina o de la BSA en el caso de los basales. El ensayo se realizó a 37°C y el tiempo de incubación fue de 5 min.

A) Concentración de ATP 0,5 mM

B) Concentración de ATP 4 mM

Cada condición se ensayó por triplicado. Los resultados expresan el porcentaje de PA formado por mg proteína x 5 min respecto al valor del control-basal para cada sustrato lipídico (100%)  $\pm$  SD. \*P < 0.050, \*\*P < 0.005, \*\*\*P < 0.0001 comparando experimental vs. Control y #p < 0.050, ##p < 0.005, ###p < 0.0005 comparando Ins+Vto+NaF vs. Ins+Vto.



**Fig. 45- Participación de la vía PI3K/Akt en la acción de la insulina sobre la actividad de la DAGK**

Se utilizaron 250  $\mu$ M de DPG o SAG en micelas de DMSO (0,1%) y 500  $\mu$ M de ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ , 3  $\mu$ Ci/muestra. La concentración utilizada de Ins, Vto y LY294002 fue de 200 nM, 200  $\mu$ M, 10  $\mu$ M respectivamente. El tiempo de reacción fue medido a partir del agregado de las membranas sinaptosomales, seguido de 15 segundos de sonicación e inmediato agregado de la insulina. El ensayo se realizó en presencia de 20 mM de NaF, a 37°C durante 5 min de incubación. Cada condición se ensayó por triplicado. Los resultados expresan el porcentaje de PA formado por mg proteína x 5 min frente a su respectivo control (100%)  $\pm$  SD. Se compara experimental (Ins+Vto+LY) frente a su respectivo control (Ins+Vto).

En las condiciones de ensayo los sinaptosomas mantienen un estado basal de fosforilación en tirosina (presencia de vanadato) y de Ser/Treo (presencia de NaF). El resultado, está presentado en forma de porcentaje respecto al efecto de Ins+Vto en la formación de PA a partir de DAGs exógenos. Como podemos observar en la Fig. 45, la presencia del LY294002, previa a la acción de la insulina, no modifica significativamente el estímulo en la síntesis de PA a partir de SAG o DPG.

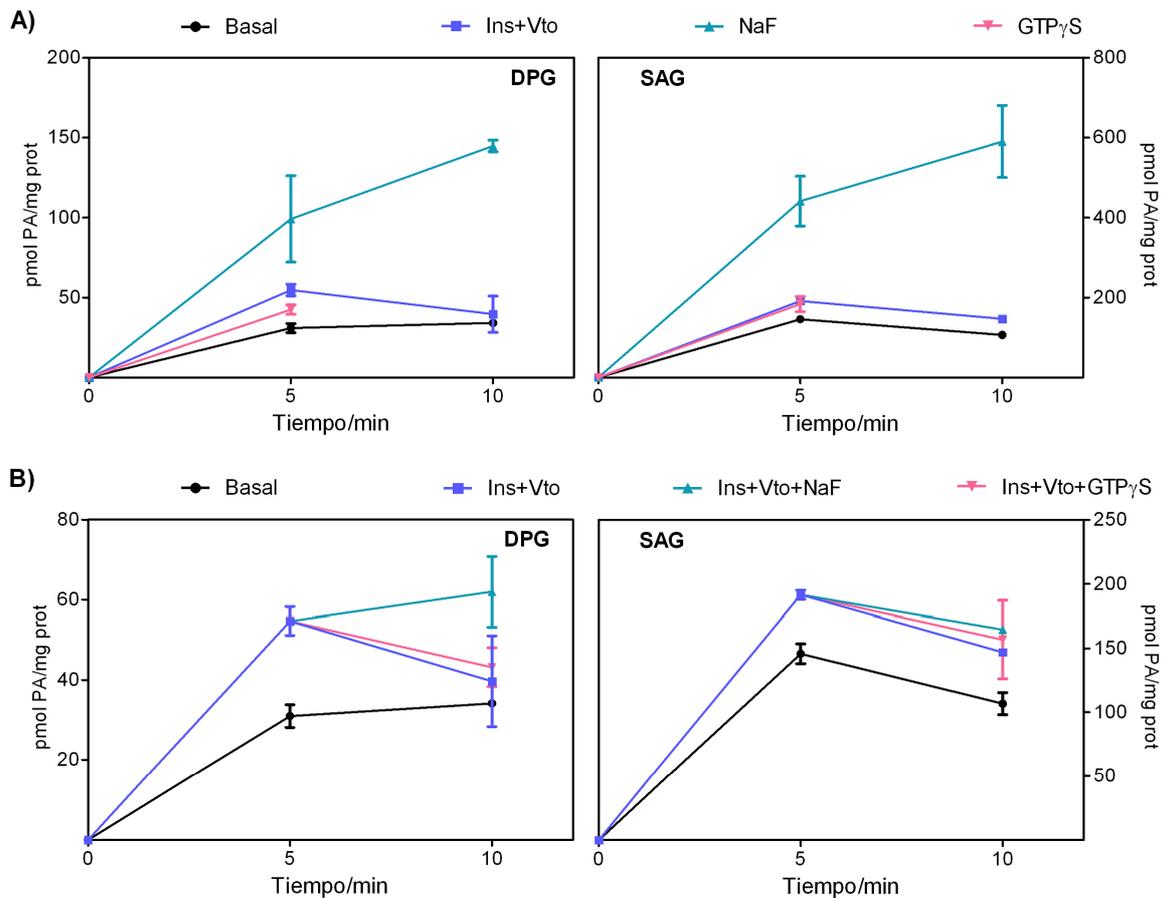
Estos resultados indican que la insulina ejerce su acción estimuladora sobre la actividad de la DAGK en forma independiente de la fosforilación en Ser/Treo a través de la acción de Akt.

#### **7.6.4 - El NaF y el GTP $\gamma$ S son reguladores positivos del estímulo de la insulina en la formación de PA a partir de SAG y DPG**

Muchos de los efectos celulares del NaF, son atribuidos a la formación de complejos con aluminio, formando fluoro aluminato, el cual activa a la proteína G heterotrimérica (Litosch, 1987). Por lo tanto, a fin de explorar la participación de la proteína G (ProtG) en el estímulo de la DAGK por acción de la insulina, se realizaron ensayos utilizando GTP $\gamma$ S, activador selectivo de la ProtG, por ser el análogo no hidrolizable de GTP (Zeng y col., 1989).

Se evaluaron los efectos de NaF ó GTP $\gamma$ S sobre la actividad DAGK medida a partir de DPG o SAG. La adición de NaF ó GTP $\gamma$ S se realizó desde el comienzo (tiempo 0) y se prolongó durante los 5 y 10 min (parte A) ó a partir de 5 min de incubación luego de la adición de Ins+Vto (parte B). Esto permite evaluar si existe independencia en la acción de los potenciales efectores con respecto a la correspondiente de Ins+Vto.

Se observa en la Fig. 46A y B, que los niveles de formación de PA de los controles se mantienen en los valores esperables, es decir que son muy superiores cuando el sustrato lipídico es SAG (145,73 vs 30,98 pmoles a los 5 min). Con ambos sustratos la presencia de Ins+Vto estimula en un mismo orden la formación de PA. Como podemos observar en la Fig. 46A, en ausencia de Ins+Vto, el NaF y el GTP $\gamma$ S estimulan la síntesis de PA a partir de SAG y DPG. Sin embargo cuando son agregados luego de 5 min de exposición a Ins+Vto, ambos agentes (NaF y GTP $\gamma$ S) no son capaces de incrementar en forma significativa la formación de PA a partir de SAG y DPG (Fig. 46B). Esto permite sugerir que la acción de ambos efectores sobre la DAGK no se produce por un mecanismo diferente al que activa la Ins+Vto (p. ej. una vía muscarínica).



**Fig. 46- Efecto del NaF y GTP $\gamma$ S en ausencia y en presencia de Ins+Vto**

Se utilizaron 250  $\mu$ M de DPG o SAG en presencia de 0,1 % de DMSO y 500  $\mu$ M de ATP-[ $\gamma$ - $^{32}$ P], 3  $\mu$ Ci/muestra. La concentración utilizada de Ins, Vto, NaF y GTP $\gamma$ S fue de 200 nM, 200  $\mu$ M, 20 mM y 200  $\mu$ M respectivamente. La actividad de la enzima fue medida en función del tiempo en ausencia (basales) y en presencia de Ins+V to.

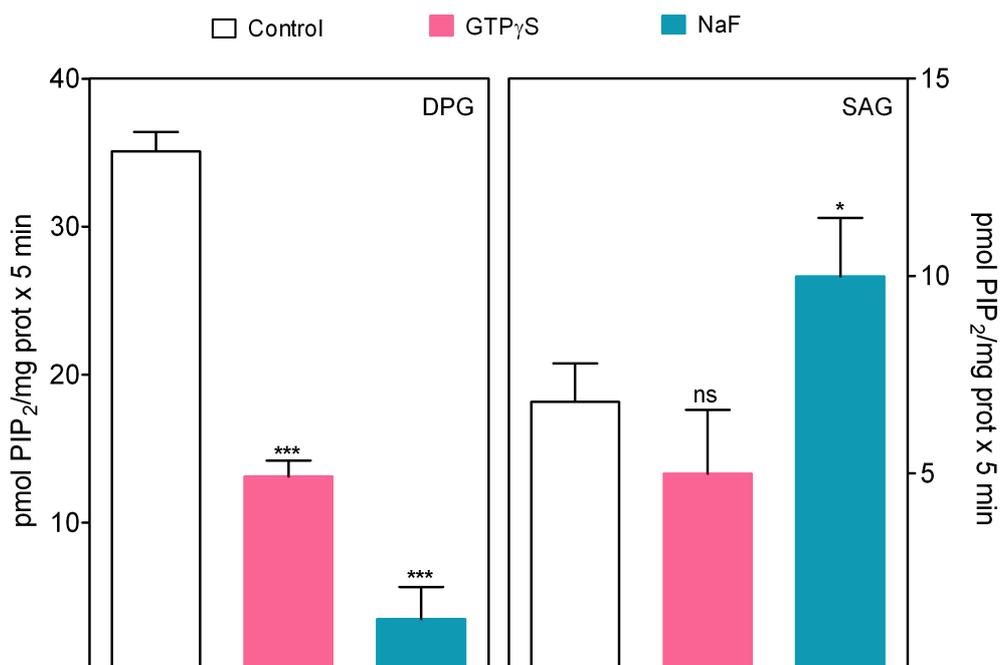
A) El NaF y el GTP $\gamma$ S fueron agregados al tiempo 0 e incubados durante 5 y 10 min.

B) El NaF y el GTP $\gamma$ S fueron agregados a los 5 min del estímulo de Ins+Vto.

El ensayo se realizó a 37 $^{\circ}$ C durante. Cada condición se ensayó por triplicado.

A partir de estos experimentos también se puede observar (Fig. 47), midiendo la radioactividad correspondiente al fosfatidilinositol bi-fosfato (PIP $_2$ ), que en ausencia del efecto Ins+Vto la presencia de GTP $\gamma$ S disminuye fuertemente la marca en éste polifosfoinosítido cuando el precursor de PA

es el DPG. Para la misma condición (DPG) la presencia de NaF produce una disminución en la marcación de PIP<sub>2</sub>. Este efecto del GTPγS, no se observa cuando el precursor de PA es el SAG, mientras que la presencia de NaF incluso estimula la marcación de PIP<sub>2</sub>. Teniendo en cuenta que en éste ensayo está presente el ATP como precursor radiactivo, se podría suponer que la disminución en la fosforilación de PIP<sub>2</sub> cuando se emplea DPG como precursor de PA, se produce por la hidrólisis del fosfolípido y la predominancia de un intermediario (di-16:0-PA) que no resulta apto para la inmediata resíntesis.



**Fig. 47- Efecto de NaF y del GTPγS en la síntesis de PIP<sub>2</sub>**

Se midió la radiactividad correspondiente al PIP<sub>2</sub> a partir del ensayo anterior. \*p < 0.040, \*\*\*p < 0.0001 comparando los experimentales vs. su respectivo valor control.

Si analizamos las Fig. 46A y 47 veremos que en presencia de DPG, mientras que el NaF y el GTPγS incrementan la síntesis de PA, la marcación de PIP<sub>2</sub> disminuye. Sin embargo, en presencia de SAG, el NaF y el GTPγS

incrementan la síntesis de PA pero la marcación de  $PIP_2$  permanece constante (Fig. 46A y 47). Es interesante mencionar que el PIP muestra un comportamiento similar (dato no presentado).

A partir de éstos resultados se podría concluir que el efecto directo de NaF y  $GTP\gamma S$  sobre la DAGK está relacionado, posiblemente a través de la participación de una proteína G.

También se podría sugerir que la síntesis de 18:0-20:4-PA, está relacionada con la resíntesis de los PPIs.

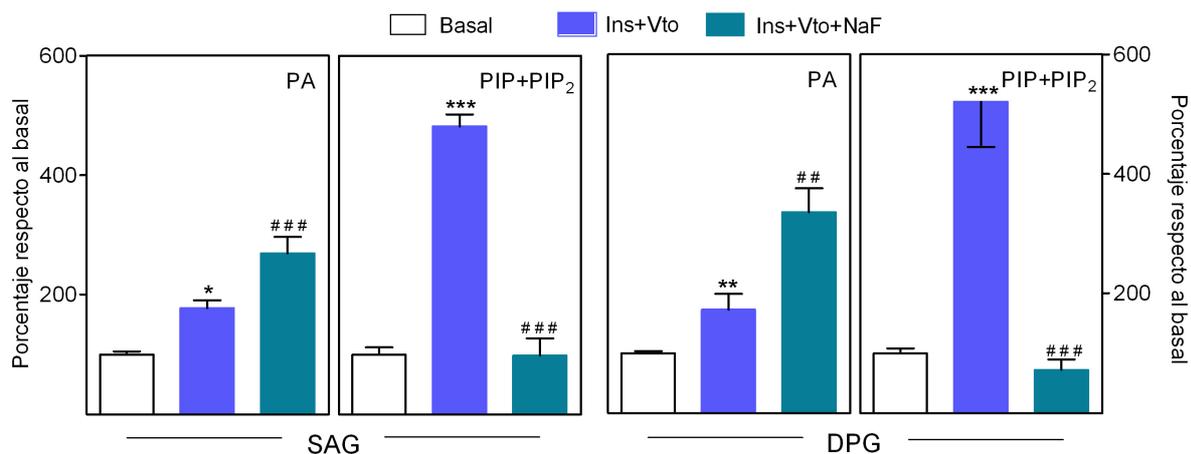
Teniendo en cuenta que el  $PIP_2$  es un potente inhibidor de la DAGK $\epsilon$ , se podría especular que la disminución en los niveles de  $PIP_2$  a través de la activación de la PI-PLC por mediación de una proteína G, podría regular positivamente la formación de PA a través de la DAGK $\epsilon$ .

Dado que hemos demostrado que la insulina activa la PI-PLC (apartado 7.4.1), la hipótesis de trabajo es que esta acción podría desencadenar la activación de la actividad DAGK $\epsilon$ .

Se evaluó entonces el efecto simultáneo del NaF y de la insulina, en presencia de Vto.

Como podemos observar en la Fig. 48, la insulina en presencia de vanadato aumenta la formación de PA a partir de ambos sustratos como también la marcación de los polifosfoinosítidos ( $PIP+PIP_2$ ). El NaF provoca un aumento adicional al estímulo de la insulina en la formación de PA a partir de ambos sustratos, sin embargo reduce drásticamente los niveles de PPIs.

Si observamos la Fig. 47, se puede advertir que en ausencia de Ins+Vto, el  $GTP\gamma S$  y en especial el NaF, parecen favorecer la resíntesis de  $PIP_2$  cuando SAG es el precursor. En éste tipo de ensayo se obtiene una resultante que es el producto de la hidrólisis y la refosforilación de los fosfoinosítidos.



**Fig. 48- Efecto del NaF en presencia de Ins+Vto**

Se utilizaron 250  $\mu$ M de DPG o SAG en presencia de 0,1 % de DMSO y 500  $\mu$ M de ATP- $[\gamma$ -<sup>32</sup>P], 3  $\mu$ Ci/muestra. Las concentraciones utilizadas de Ins, Vto y NaF fueron como en el caso anterior. El tiempo de reacción fue medido a partir del agregado de las membranas sinaptosomales, seguido de 15 segundos de sonicación e inmediato agregado de la insulina o de la BSA en el caso de los basales. El ensayo se realizó a 37°C y el tiempo de incubación fue de 5 min.

Cada condición se ensayó por triplicado. Los resultados expresan el porcentaje de PA ó PIP+PIP<sub>2</sub> formados por mg proteína x 5 min frente a su respectiva condición basal (100%)  $\pm$  SD. \*p < 0.050, \*\*p < 0.005, \*\*\*p < 0.0001 para Ins+Vto vs. Basal y ##p < 0.005, ###p < 0.0005 para Ins+Vto+NaF vs. Ins+Vto.

Sin embargo, en presencia de Ins+Vto que estimula a la PI-PLC y aumenta en forma potente la resíntesis (Fig. 48), la hormona no consigue revertir la caída de la marcación en los fosfoinosítidos por acción del NaF, aún en el caso de que SAG sea el precursor. A pesar de que la caída de la marca es más notable cuando DPG es precursor de PA, la resultante entre la fosforilación e hidrólisis sigue siendo negativa cuando al efecto de Ins+Vto se suma el de NaF.

Este hallazgo no se explica cuando se interpreta que el NaF sólo ejerce sus efectos a través de la activación de proteínas G. Ha sido demostrado que en cerebro de rata, en condiciones de estímulo de la PI-PLC por acción de carbacol, el NaF inhibe la fosfatidilinositol quinasa (PIK) (Claro y col.,

1990). Los autores sugieren que el NaF presenta un mecanismo dual, activando a la fosfolipasa C a través de la activación de ProtG por formación de fluoro aluminato, y mediante la inhibición de la fosforilación de los fosfoinosítidos.

Nuestros datos indican que la insulina en presencia de vanadato, estimula la hidrólisis del  $PIP_2$  a través de la activación de la PI-PLC, pero también aumenta la resíntesis, evidenciada por el marcado aumento de los PPIs en presencia de la hormona comparada con el control. Sin embargo, la presencia del NaF inhibe la marcación de los PPIs, probablemente a través de los dos mecanismos mencionados, estimulando la hidrólisis del  $PIP_2$  por acción de la PI-PLC a través de la activación de la proteína G (Cockcroft y Taylor, 1987; Litosch, 1987) e inhibiendo la PIK, dando como resultado, una marcada caída en los niveles de PPIs. Esto provoca una marcada reducción en los niveles de  $PIP_2$ , lo que podría explicar un marcado aumento en la actividad de la DAGK $\epsilon$  a través de la desregulación negativa de la isoforma.

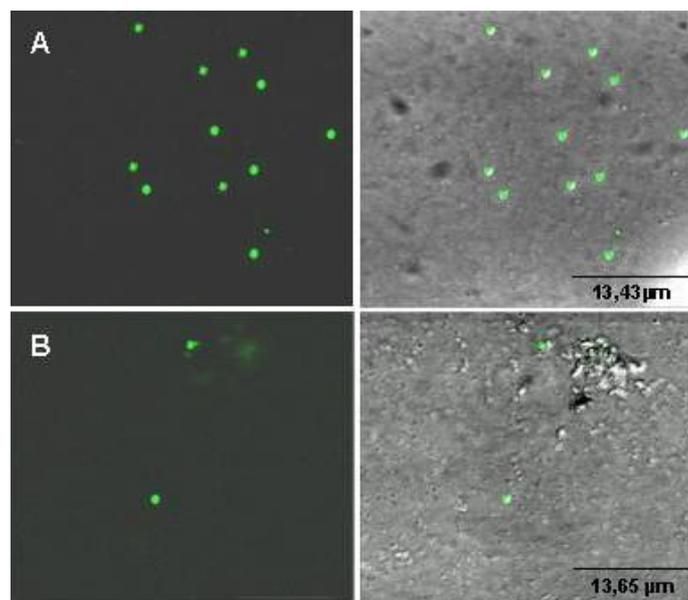
#### **7.6.5 - La isoforma $\epsilon$ de la DAGK está presente en las preparaciones sinaptosomales de CC.**

Los datos obtenidos sobre la preferencia de sustrato para la actividad DAGK actuante sobre DAGs exógenos y la ausencia de inhibición en su actividad por R59022 y R59949, nos llevaron a pensar que en los ensayos se detectaba especialmente una actividad DAGK  $\epsilon$  (Capítulo I).

Los estudios sobre la acción estimuladora de la actividad DAGK, que ejerce la insulina independiente del estímulo en la generación de DAGs por activación de fosfolipasas (PI-PLC y PC-PLD) (Zulian y col., 2006), realizados con DAGs exógenos, evidencian que no sólo el efecto sino su regulación, presentan similitudes, ya sea cuando se utiliza SAG o DPG. Esto

nos lleva a suponer que el estímulo provocado por la hormona se ejercería sobre ésta isoforma que muestra una capacidad preferencial para transformar SAG.

Dado ésta característica particular, pero teniendo en cuenta que la DAGK zeta (DAGK $\zeta$ ) también es una isoforma insensible a los inhibidores mencionados (R59022 y R59949), se analizó mediante inmunofluorescencia, la presencia de la DAGK $\epsilon$  y de la DAGK $\zeta$  en los sinaptosomas de CC de ratas Wistar, siguiendo el procedimiento que se detalló en Materiales y Métodos, apartado 6.7.3.



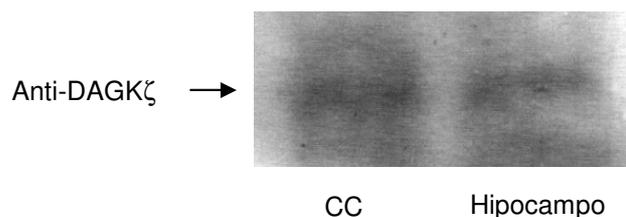
**Fig. 49- Microscopía de fluorescencia de sinaptosomas de CC marcados con anti-DAGK $\epsilon$  y anti-DAGK $\zeta$**

- A) anti-DAGK $\epsilon$
- B) anti-DAGK $\zeta$

El tamaño y homogeneidad de las estructuras sinaptosomales, aproximadamente de 1-1,2  $\mu\text{m}$ , fue corroborado mediante la visualización con transmisión (Nomarski) (paneles derechos) y comparando los valores

obtenidos por TEM (Fig. 36). Como se puede observar en la Fig. 49A, la densidad de marca fluorescente es comparativamente mayor que en la Fig. 49B, sugiriendo que la DAGK $\epsilon$  se encuentra en mayor proporción que la DAGK $\zeta$  en los sinaptosomas de CC. Las fotografías fueron obtenidas en escalas similares (A: 14,43  $\mu\text{m}$  y B: 13,65  $\mu\text{m}$ ), conteniendo las suspensiones similar carga sinaptosomal.

También se pudo comprobar por análisis de *western blot*, la presencia de la DAGK $\zeta$ , con un peso molecular de aprox. 110 KDa. El anticuerpo primario para esta isoforma, fue diluido en una proporción de 1:750 en solución de bloqueo (leche descremada al 5%), tal como se detalla en Materiales y Métodos, apartado 6.7.2. Se reveló la presencia de la proteína utilizando un anticuerpo secundario frente a IgG de conejo (dil. 1:2000) conjugado con peroxidasa de rábano (HRP). También se pudo detectar la presencia de ésta isoforma en membranas sinaptosomales de hipocampo de ratas adultas (Fig. 50).



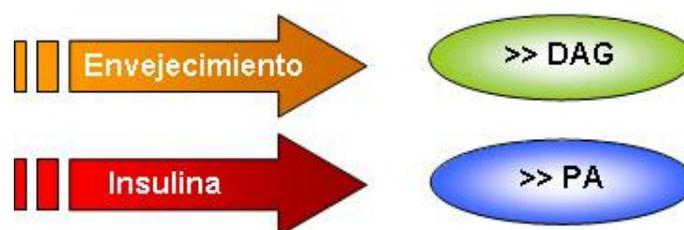
**Fig. 50- Western Blot de proteínas sinaptosomales de CC y de hipocampo, marcados con anti-DAGK $\zeta$**

### Capítulo III: Estudio de la activación de la DAGK por acción de la insulina, en el SNC de ratas seniles.

En estudios realizados en nuestro laboratorio, se ha reportado que en los sinaptosomas de CC de ratas seniles, hay un desbalance en las actividades enzimáticas ligadas a la formación de DAG y PA.

Se ha observado que la actividad de la DAGK se encuentra disminuida en los animales seniles (Salvador y col., 2005), mientras que la vía PLD/PAP2 se encuentra aumentada (Pasquare y col., 2001). Estos hallazgos sugirieron que en el envejecimiento habría una mayor disponibilidad de DAG.

Se ha demostrado además, que la insulina provoca un aumento en la actividad de la PLD y de la DAGK, mientras que no modifica la actividad de la PAP2, produciendo un aumento de los niveles de PA. Sin embargo, en los animales seniles, la insulina no fue capaz de estimular la actividad de la PLD, pero en cambio inhibió a la PAP2. Además, aunque en los animales seniles se observó una menor actividad de la DAGK, se mantuvo el estímulo de la insulina, recuperando de ésta forma, los niveles de PA del adulto (Salvador y col., 2005). Como resultado, la acción de la insulina promueve una mayor disponibilidad de PA.



En este Capítulo se presentan los resultados de los ensayos realizados a fin de determinar la actividad de la DAGK en sinaptosomas de hipocampo, utilizando DAG endógeno y DAG exógeno de diferente composición, comparando su actividad con los datos obtenidos de sinaptosomas de CC y evaluando además la acción de la insulina. Estos estudios se realizaron utilizando animales adultos y seniles, a fin de comparar la actividad de la DAGK en las distintas condiciones y evaluando los efectos en el envejecimiento.

#### **7.7 - Cuantificación de los DAGs en los sinaptosomas de corteza cerebral de ratas seniles**

Para determinar si existía una mayor disponibilidad de DAGs en los terminales sinápticos de animales seniles, se cuantificaron los DAGs de los sinaptosomas de CC de ratas seniles de 28 meses y adultas de 4 meses.

Se utilizó cromatografía gaseosa para la cuantificación de los metil-ésteres de ácidos grasos (FAME), obtenidos por metanólisis de los DAGs, tal como se detalla en Materiales y Métodos, apartado 6.4.

Del análisis de los FAME, se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla V.

Como podemos observar en la tabla, el nivel de los DAG en los sinaptosomas de CC de animales seniles, en condiciones basales, aumenta en un 59%, respecto a los niveles en el adulto. Estos datos apoyan la sugerencia realizada, sobre la base de un desbalance en las actividades enzimáticas ligadas al control de los niveles de DAG y PA (Salvador y col., 2005; Pasquare y col., 2001; Salvador y col., 2005).

<b>Especie</b>	<b>Adultos nmol/mg prot</b>	<b>Seniles</b>
14:0	0,293	0,735
14:1	0,272	0,778
15:0	0,115	0,298
15:1	2,106	8,174
16:0	1,118	1,962
16:1	0,332	0,925
17:0	0,472	0,611
17:1	3,527	8,213
18:0	3,874	5,395
18:1	1,124	1,875
18:2	0,475	1,034
18:3	1,737	1,759
20:4	6,142	2,241
23:1	0,957	1,262
22:4	0,744	1,304
22:6	1,109	2,204
Total AG	24,398	38,770
<b>Total DAG</b>	<b>12,199</b>	<b>19,385</b>

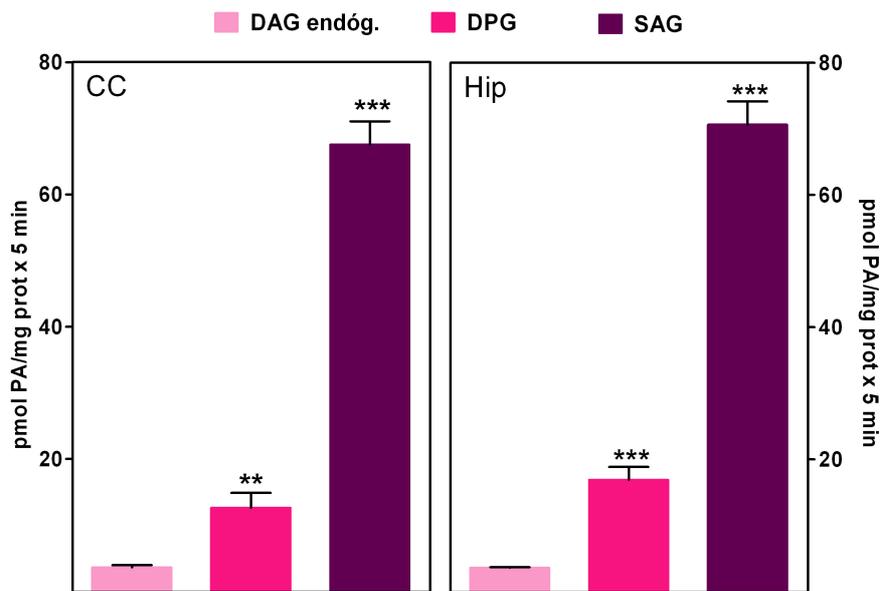
**Tabla V- Cuantificación de los DAG de sinaptosomas de CC de animales adultos y seniles.**

Se analizaron los ácidos grasos provenientes de los DAGs por cromatografía gaseosa tal como se detalló en Materiales y Métodos apartado 6.4.

### **7.8 - Actividad de la DAGK en los sinaptosomas de hipocampo de animales adultos y seniles**

Los sinaptosomas de hipocampo utilizados en estos ensayos, fueron obtenidos de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos, apartado 6.2.3. Se utilizaron para el estudio, ratas adultas de 4 meses y seniles de 28 meses de edad.

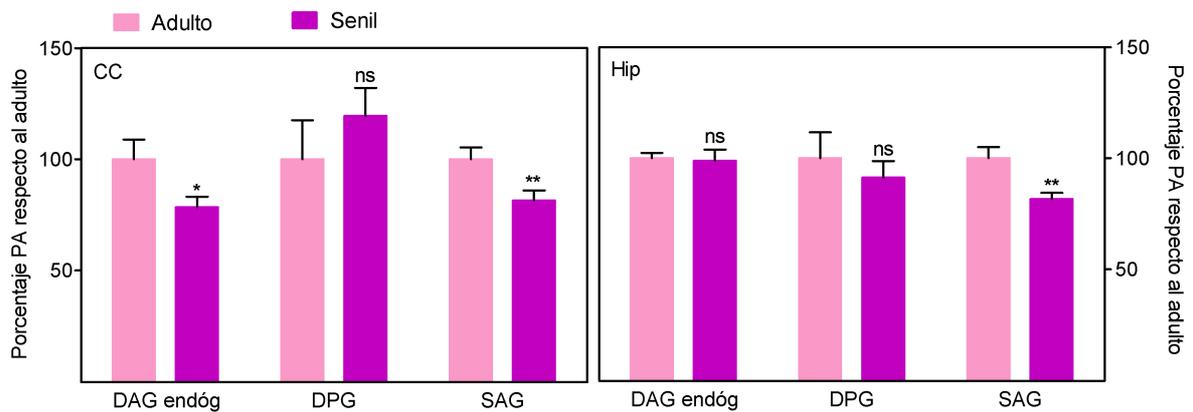
Como se observa en la figura 51, de manera similar a lo que ocurre en los sinaptosomas de CC, en los sinaptosomas de hipocampo de ratas adultas la actividad de la DAGK fue significativamente mayor en presencia de DPG y más aún en presencia de SAG cuando se la compara con la actividad sobre DAGs endógenos.



**Fig. 51- Actividad DAGK en sinaptosomas de CC e Hipocampo de animales adultos**

Se utilizaron DAG endógeno, DPG o SAG (250  $\mu$ M) en presencia de 50 mM de OG y 250  $\mu$ M de ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ , 3  $\mu$ Ci/muestra. El tiempo de reacción fue medido a partir del agregado de las membranas sinaptosomales, seguido de 15 segundos de sonicación. El ensayo se realizó a 37°C y el tiempo de incubación fue de 5 min. Cada condición se ensayó por triplicado. \*\* $p < 0.002$ , \*\*\* $p < 0.0003$  comparando los valores obtenidos con DPG y SAG vs. DAG endógeno para cada tejido ensayado.

Si se compara la actividad de la DAGK entre los animales adultos y seniles, se puede observar que en los sinaptosomas de CC de ratas seniles en las condiciones basales, la actividad de la enzima en presencia de DAG endógeno se encuentra disminuida con respecto a las adultas (Fig. 52). Esto no se observa en los sinaptosomas de hipocampo. Los resultados, representados como porcentajes respecto a la actividad obtenida en las terminales sinápticas de animales adultos (100 % en cada caso), permiten comparar el efecto del envejecimiento en la actividad DAGK sobre el sustrato endógeno y exógeno.



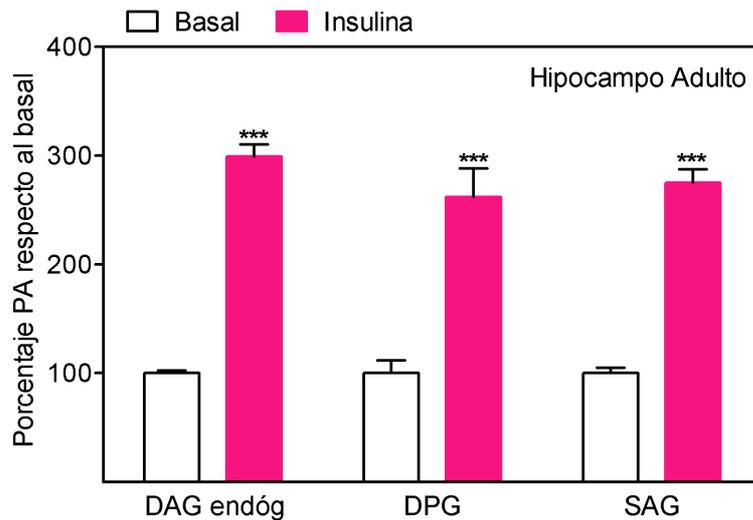
**Fig. 52- Actividad DAGK en sinaptosomas de CC e hipocampo de ratas adultas y seniles**

El ensayo se realizó en las mismas condiciones que para la Fig. 51, empleando sinaptosomas de corteza cerebral e hipocampo de ratas adultas de 4 meses y seniles de 24-28 meses. Cada condición se ensayó por triplicado. Los resultados expresan el porcentaje de PA formado por mg proteína x 5 min frente a su respectivo valor en el adulto (100%)  $\pm$  SD. \* $p < 0.02$ , \*\* $p < 0.007$  comparando senil vs. adulto.

Se puede observar que la utilización de DPG es similar al valor de los adultos, tanto en el hipocampo como en CC, mientras que por el contrario la utilización de SAG se halla disminuida en animales seniles en aproximadamente un 18%. Éstos resultados son consistentes con los observados por Salvador y col. (Salvador y col., 2005), ya que en aquellos ensayos experimentales, se utilizaron como sustrato, los DAG-[ $^3\text{H}$ ] provenientes de retinas bovinas, que poseen una gran proporción de ácidos grasos insaturados en su composición. (Tabla II), comparables con los SAG utilizados en esta oportunidad.

### 7.8.1 – Efecto de la insulina sobre la actividad de la DAGK en sinaptosomas de hipocampo de animales adultos y seniles

Se evaluó el efecto de la insulina sobre la actividad de la DAGK medida en los sinaptosomas de hipocampo de animales adultos, comparado con el efecto producido por la hormona en los sinaptosomas de CC.



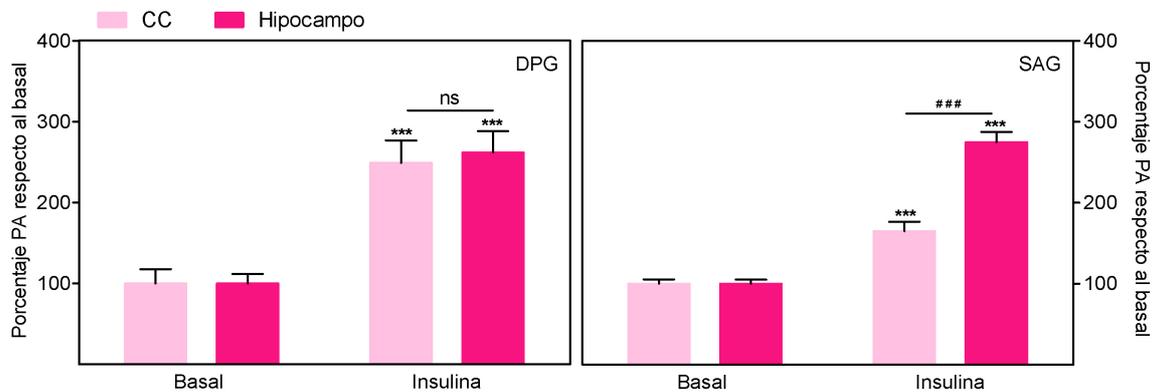
**Fig. 53- Acción de la insulina sobre la actividad de la DAGK en sinaptosomas de hipocampo de ratas adultas**

Se utilizaron DAG endógeno, DPG o SAG (250  $\mu$ M) en presencia de 50 mM de OG y 250  $\mu$ M de ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ , 3  $\mu$ Ci/muestra. El tiempo de reacción fue medido a partir del agregado de las membranas sinaptosomales, seguido de 15 segundos de sonicación e inmediato agregado de la insulina (200 nM) o de la BSA en el caso de los basales. El ensayo se realizó a 37°C y el tiempo de incubación fue de 5 min. Cada condición se ensayó por triplicado. Los resultados expresan el porcentaje de PA formado por mg proteína x 5 min frente a su respectiva condición basal (100%)  $\pm$  SD. \*\* $p < 0.002$ , \*\*\* $p < 0.0003$  para insulina vs. basal.

Como se puede observar, la insulina estimula aproximadamente 2 veces la actividad de la DAGK de sinaptosomas de hipocampo, con respecto al basal sin insulina, siendo el estímulo similar para la utilización de DAG endógeno, DPG o SAG.

Si se compara la acción de la insulina en sinaptosomas de hipocampo con los de CC (Fig. 54), se observa que la activación de la DAGK por la hormona a partir de DPG es similar en CC e hipocampo. Sin embargo, en presencia de SAG, la activación de la DAGK por la insulina es significativamente

superior en hipocampo respecto a CC, siendo el estímulo de insulina de un 65% en CC y de un 175% en hipocampo (Fig. 54).

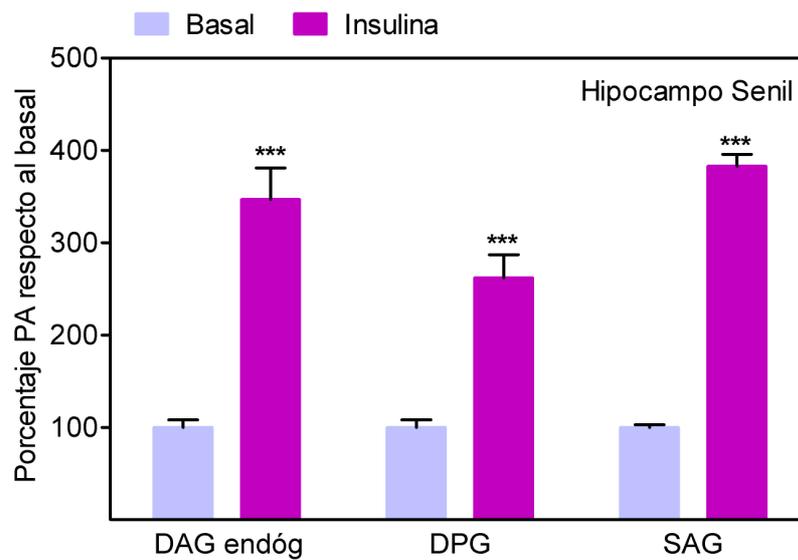


**Fig. 54- Actividad de la DAGK en sinaptosomas de hipocampo y CC de ratas adultas. Efecto de la insulina.**

Las condiciones del ensayo fueron como en la Fig. 53. Cada condición se ensayó por triplicado. Los resultados expresan el porcentaje de PA formado por mg proteína x 5 min frente a su respectivo valor basal (100%)  $\pm$  SD. \*\*\*p < 0.0001 comparando Insulina vs. Basal para CC ó Hip y ###p < 0.0001 comparando Hip vs. CC en la condición Insulina.

Cuando se compara la actividad de la DAGK de los sinaptosomas de hipocampo de los animales seniles respecto a la de adultos, se observa que la insulina estimula significativamente la actividad de la DAGK con respecto al basal sin la hormona, tanto a partir de DAGs endógenos, como en presencia de DPG o de SAG, aunque se observa un menor estímulo cuando el DPG es utilizado como sustrato (Fig. 55).

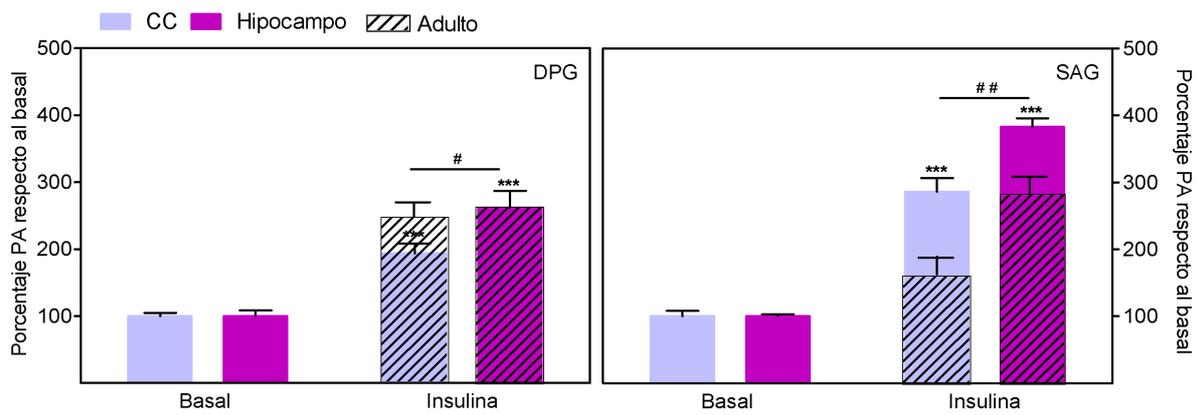
En la figura 56 se presentan, en forma comparativa, los datos obtenidos de sinaptosomas de los animales adultos de la Fig. 54 (barras rayadas superpuestas) con los datos obtenidos en los animales seniles, a fin de destacar la acción de la insulina sobre la actividad DAGK en presencia de DAGs exógenos.



**Fig. 55- Acción de la insulina sobre la actividad de la DAGK en sinaptosomas de hipocampo de ratas seniles**

Las condiciones del ensayo fueron como en la Fig. 53 pero ensayando la actividad de la DAGK en sinaptosomas de hipocampo de ratas seniles de 24-28 meses. El ensayo se realizó a 37°C y el tiempo de incubación fue de 5 min. Cada condición se ensayó por triplicado. Los resultados expresan el porcentaje de PA formado por mg proteína x 5 min frente a su respectivo basal (100%) ± SD. \*\*\*p < 0.0001 para Insulina vs. Basal.

Quando comparamos el efecto de la hormona en Hip y en CC, pudimos observar que en los sinaptosomas de hipocampo de animales seniles, la insulina estimula la formación de PA a partir de DPG en el mismo orden que en los adultos, mientras que se observa una leve disminución en la CC. En cambio cuando el PA provenía de SAG, el estímulo de la insulina en animales seniles fue muy superior al de los adultos en ambas preparaciones, conservando así mismo el mayor efecto estimulatorio en el hipocampo.



**Fig. 56- Actividad de la DAGK en sinaptosomas de hipocampo y CC de ratas seniles. Efecto de la insulina.**

Se representan los valores de PA obtenidos a partir de los ensayos realizados en animales seniles, superponiendo con barras rayadas el valor obtenido a partir de los adultos y representados en la Fig. 54. Las condiciones del ensayo fueron como en la Fig. 53. Cada condición se ensayó por triplicado. Los resultados expresan el porcentaje de PA formado por mg proteína x 5 min frente a su respectivo valor basal (100%)  $\pm$  SD. \*\*\* $p < 0.0001$  comparando Insulina vs. Basal para CC ó Hip. # $p < 0.001$  y ## $p < 0.0001$  comparando Hip vs. CC en la condición Insulina.

En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio se demostró que la insulina regula vías de transducción de señales en el SNC, que involucran moléculas lipídicas (Salvador y col., 2005) y que además, son afectadas por el proceso de envejecimiento normal.

En el presente trabajo de tesis se presentaron los resultados y la interpretación de diferentes experiencias realizadas para entender uno de los mecanismos moleculares involucrados en la vía de señalización de la insulina en el SNC. Se abordó, específicamente, la acción de la insulina como activadora de la formación de ácido fosfatídico a través del estímulo de la actividad DAGK, evaluando también a la misma en un modelo de envejecimiento normal.

Se utilizó como modelo experimental a los sinaptosomas purificados de CC e hipocampo de rata, de animales adultos y seniles. Esta preparación enriquecida en terminales pre-sinápticos resellados, es representativa de la porción neuronal rica en contactos sinápticos que almacenan los neurotransmisores, componente básico de la neurotransmisión y de la comunicación intercelular.

La insulina y el RI se encuentran distribuidos en áreas específicas del cerebro, donde ejercen diferentes funciones. En los procesos neurodegenerativos como ser en el envejecimiento, se ha sugerido que se produce una desregulación de la señal de la insulina, principalmente en regiones asociadas con el aprendizaje y la memoria, como son las regiones de la CC y del hipocampo (Zhao y col., 2004). Por tal motivo, en el presente trabajo de tesis, se evaluó el rol de la insulina específicamente en sinaptosomas de éstas regiones.

Se demostró que la insulina estimula la formación de PA, incrementando la actividad de la DAGK sinaptosomal (Fig. 25) y que la activación de la DAGK se lleva a cabo a través de dos mecanismos:

1) incrementando los niveles de DAG en la membrana plasmática a partir del estímulo de fosfolipasas, lo cual resulta en un incremento en la acción de la DAGK, efecto dependiente de fosfolipasas (EDF)

2) estimulando la DAGK en forma directa e independiente de la generación de DAGs en la membrana, efecto independiente de fosfolipasas (EIF).

En una primera etapa se debió encontrar las mejores condiciones experimentales para evaluar la actividad de la DAGK, tanto a partir del DAG endógenos, necesario para el análisis del mecanismo de activación por EDF, como también a partir de DAG exógenos, enfoque metodológico implementado para entender la acción denominada EIF.

La DAGK, que presenta 10 isoformas, utiliza como sustrato al diacilglicerol, un lípido neutro de baja solubilidad en medios acuosos y como co-sustrato al ATP. El estudio de ésta actividad en las preparaciones sinaptosomales se realizó con sustratos radiomarcados, como ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ , empleando DAG endógenos y exógenos ó DAG- $[\text{}^3\text{H}]$  en presencia de ATP.

Es conocida la dependencia de la actividad DAGK por fosfolípidos ó detergentes (Epanand y Topham, 2007; Fanani y col., 2004). Estos hallazgos, que se han determinado incluso con enzimas purificadas, han permitido demostrar cierta selectividad de las diferentes isoformas por determinados detergentes.

Por estas razones, en una primera etapa, fue necesario estudiar la actividad de la DAGK sinaptosomal, utilizando distintos detergentes, como agente vehiculizador del lípido y potencial activador de la enzima.

Dado que el principal interés de esta tesis era evaluar la participación de la DAGK en la acción de la insulina en este sistema membranoso complejo, el

primer objetivo fue 1) descartar el empleo de aquellos detergentes que inhibieran o estimularan excesivamente alguna isoforma; 2) evitar aquellos detergentes que estimularan actividades hidrolíticas sobre el sustrato lipídico.

En base a los resultados obtenidos, en este trabajo de tesis (Capítulo I), los detergentes de elección fueron el OG y el DMSO. Con el uso de micelas de DAG-DOC, se observó muy baja actividad enzimática. El DOC que es un detergente ampliamente utilizado para medir la actividad DAGK, presenta una marcada actividad para isoformas citosólicas del tipo I, de importante presencia en cerebro (Merida y col., 2008). Por el contrario, la DAGK<sub>e</sub> (isoforma de membrana), muestra una baja actividad en este sistema micelar (Walsh y col., 1994). Estos autores muestran también que mientras el Tritón X-100 es selectivo para medir la actividad de esta isoforma, con el OG no se observa una estricta selectividad hacia isoformas membranosas.

Por estos motivos el OG resultó un detergente muy conveniente para medir la actividad DAGK, en especial cuando se estudiaron sus características cinéticas.

El DMSO fue otro de los detergentes elegido dado que en micelas formadas con éste detergente prevaleció la actividad quinásica y no la lipásica frente a la utilización de DAGs exógenos (Fig. 12). Además, es ampliamente utilizado para disolver agentes poco solubles, siendo conveniente su uso para estudiar la regulación de la actividad DAGK. Existe amplia bibliografía relacionada con su empleo en la vehiculización de agentes en células en cultivo. Otra ventaja que encontramos para utilizar al DMSO, como agente detergente, fue que en estos ensayos utilizando ATP-[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] se pudo medir simultáneamente la fosforilación de lípidos de inositol, mientras que en los ensayos utilizando OG, por alguna razón aún no determinada, la marcación

de los PPIs fue indetectable, lo que podría sugerir una inhibición de las quinasas de fosfoinosítidos por OG.

También en el capítulo I, mostramos los resultados obtenidos para estudiar los parámetros cinéticos aparentes de la actividad enzimática en sinaptosomas de CC de rata. Este análisis se hizo utilizando los DAGs endógenos como también DAGs exógenos de diferente composición en ácidos grasos.

Solo una de las diez isoformas de las DAGK (DAGK $\epsilon$ ) presenta preferencia por diacilglicéridos que contienen araquidonato en posición 2, ya que las nueve restantes son capaces de transformar idénticamente DAGs de composición en acilos saturados y de corta cadena (di-10:0) ó poliinsaturados. Para el estudio se analizaron los parámetros cinéticos aparentes para DAGK frente al DPG, como representante de DAGs saturados y frente al SAG, que contiene araquidonato en posición 2.

Los resultados obtenidos indicaron que, en las condiciones de ensayo elegidas y utilizando OG o DMSO como detergente, las preparaciones sinaptosomales de CC de rata presentaron una notoria avidez para fosforilar al SAG frente a su capacidad para transformar al DPG. Los valores de Vmax para SAG superaron en 9 veces el valor obtenido con DPG. Si comparamos los valores de Km aparente para la actividad DAGK revelaron mayor afinidad por DPG y menor afinidad por ATP en presencia de DPG.

Estudios recientes sobre la DAGK  $\epsilon$  y  $\zeta$  indicarían que, aunque la segunda también utiliza el DAG conteniendo araquidonato en posición 2, esta isoforma también fosforila al 1,2-dioleoilglicerol (DOG) (Thirugnanam y col., 2001). Los resultados obtenidos en sinaptosomas expuestos a micelas de DOG-OG indicaron que la DAGK mantiene preferencia por SAG (Fig. 23).

También se podría sugerir que las propiedades físicas diferenciales de la micela conformada por lípidos con distinto grado de saturación en sus acilos, serían las responsables de provocar la preferente actividad de la DAGK sobre SAG. Sin embargo, la presencia de SAG en las micelas de DPG, no favorecieron la actividad sobre DPG. De los resultados obtenidos cuando se utilizaron ambos sustratos, se podría interpretar también que la preferencia en la transformación del SAG respecto a DPG tampoco es consecuencia de un efecto regulatorio positivo del DAG insaturado sobre isoformas insensibles a la composición del sustrato.

Estos resultados sugirieron que, a pesar de haber supuesto que la actividad representaría un promedio de las diferentes isoformas presentes, en estas condiciones se privilegió la medida de la actividad DAGK $\epsilon$ . Se ha reportado recientemente que la preferencia de sustrato es una característica importante y distintiva para la DAGK $\epsilon$ , que no es consecuencia de una diferencia en las propiedades físicas del lípido en la membrana, sino que se relaciona a la interacción específica del araquidonato en el sitio activo de la enzima (Thirugnanam y col., 2001).

En cuanto a los estudios cinéticos, realizados en las membranas sinaptosomales expuestas a las micelas de DAG-detergente, si bien es un sistema complejo para establecer parámetros enzimáticos, fueron diseñados por considerarlos especialmente necesarios para poder utilizar las concentraciones adecuadas de ambos sustratos ATP y DAG (DPG y SAG), evitando que alguna de ellas fuera una concentración saturante para la enzima. Este aspecto debe ser tenido en cuenta ya que la evidencia de la actividad de esta isoforma radica en la diferente avidez por SAG. El empleo de una concentración de un tipo de DAG que fuera saturante para la enzima, podría inducir a evaluar erróneamente los resultados.

Las concentraciones utilizadas fueron de 250  $\mu\text{M}$  o 500  $\mu\text{M}$  de ATP, ambas concentraciones no saturantes y 250  $\mu\text{M}$  de DAG, siendo ésta una concentración no saturante para ambos DAGs utilizados. Por otra parte, esta concentración representa aproximadamente 10 veces el valor endógeno, lo que asegura que la producción de DAGs por actividad fosfolipásica no influye en el contenido ni en la composición del sustrato.

En el capítulo II se presentaron los resultados obtenidos cuando se estudió la acción de la insulina sobre la actividad DAGK de sinaptosomas de CC.

Se pudo observar que el aumento en la formación de PA por acción de la insulina, está asociado a la activación de la DAGK, como puede deducirse del empleo del inhibidor de la DAGK, el R59022 (Fig. 26). Llamativamente, en presencia de este inhibidor, se observó un fuerte aumento en los niveles de  $\text{PIP}_2$  en presencia de la hormona (Fig. 27), lo que podría sugerir una correlación inversa entre la formación del PA y el  $\text{PIP}_2$ .

Una estrategia que permite indirectamente evaluar el aporte de las diferentes vías fosfolipásicas, que producen directa o indirectamente DAGs, es el empleo de inhibidores específicos.

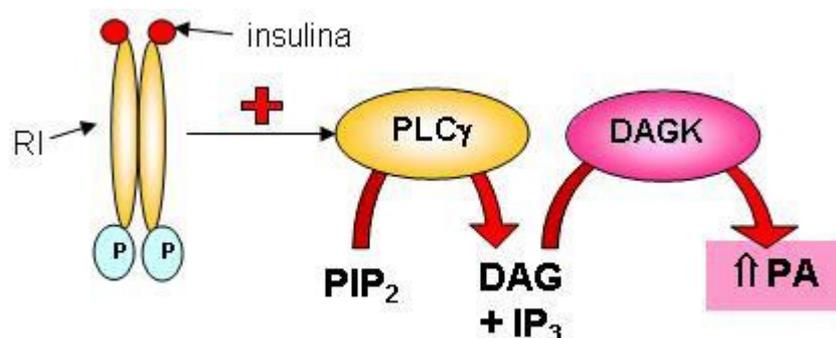
En los experimentos realizados con neomicina como inhibidor de la PI-PLC pudo demostrarse una inhibición de esta fosfolipasa, observado por el aumento en los niveles de fosforilación de  $\text{PIP}_2$  (Fig. 28), y una disminución en la síntesis de PA. Este efecto sólo fue significativo en presencia de vanadato (Fig. 29), cuando el estímulo de insulina duplicó la formación de PA, indicando que la generación de DAGs a partir de la hidrólisis de los  $\text{PIP}_2$  por la PI-PLC es mediado por un mecanismo potenciado por la fosforilación en residuos de tirosina.

La presencia de vanadato en el medio, que favorece la acción hormonal protegiendo la fosforilación en tirosina por la vía tirosina quinasas, permitió

observar el efecto inhibitorio que neomicina llevaba a cabo sobre la estimulación que ejercía la insulina en la formación de PA (Fig. 29).

La activación de una PI-PLC por la insulina fue comprobada mediante un ensayo de pulso y demarcación cuyos resultados se presentaron en la Fig. 30. Allí se puede observar que la activación de la PI-PLC, evaluada a través de la marcación de  $PIP_2$  cuando en el medio se diluye el precursor radiactivo, presenta una rápida caída que es máxima a los 2 minutos de la exposición a la hormona, lo cual indicaría que el  $PIP_2$  está siendo hidrolizado por acción de la PI-PLC, generando DAG e  $IP_3$  en un mecanismo disparado por la insulina.

Esquematizando, se podría resumir que el mecanismo de activación de la DAGK por la insulina, producido como consecuencia del aumento de sustrato y a partir de los DAGs generados a partir de la vía PI-PLC en sinaptosomas podría ser el siguiente:



La participación de una PLC $\gamma$  en este efecto surge como consecuencia del conocido efecto que ejercen las hormonas que actúan por la vía de RTK, tal como EGF y PDGF, activando a esta isoforma de la PI-PLC a través de la fosforilación en tirosina (Nelson y col., 2008; Schmidt y col., 2000). También cuando se protegió el estado fosforilado en tirosina se pudo observar la mediación de PI-PLC (Fig. 29).

Aunque este tipo de mecanismo transductor no ha sido muy documentado para la acción de la insulina, se ha reportado que en adipocitos esta hormona, a través de PI3K, activaría a la PI-PLC $\gamma$  (Eichhorn y col., 2001). Si bien en nuestro sistema experimental (sinaptosomas de CC) ha sido demostrada la activación de la vía PI3K-Akt por la insulina (Uranga y col., 2007), las experiencias realizadas para evidenciar la mediación de esta vía en la formación de PA activada por la hormona fueron negativos (Fig. 45).

Por otra parte, un mecanismo de transducción de señal con activación de PI-PLC $\beta$  ha sido demostrado para la acción de interleuquina 1a y para el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), que ejercerían este efecto a nivel nuclear (Faenza y col., 2005; Marmioli y col., 1994). IGF-1, ejercería los efectos mitogénicos a nivel nuclear a través de la activación de la PKC $\alpha$  y en el cierre de la señal participaría una DAGK nuclear (Martelli y col., 2000).

Si bien la mediación de la isoforma beta de la PI-PLC, implicaría la participación de una proteína G, los resultados obtenidos en el modelo de activación de DAGK sobre DAGs exógenos, muestran que su activación por proteína G activada (GTP $\gamma$ S y NaF) parece estar relacionada fuertemente con la vía de transducción de la insulina. Hasta el momento, sobre la base de los resultados presentados en esta tesis, no se puede asegurar ni descartar, la participación de una isoforma beta de PI-PLC en la activación de la DAGK por la generación del sustrato DAG.

En los experimentos en presencia de etanol, como agente activador de la síntesis de fosfatidiletanol a partir de PA, o en presencia del inhibidor de la PAP2, el DL-Propranolol, se pudo observar una inhibición en la formación de PA tanto a nivel basal, como también luego del estímulo hormonal,

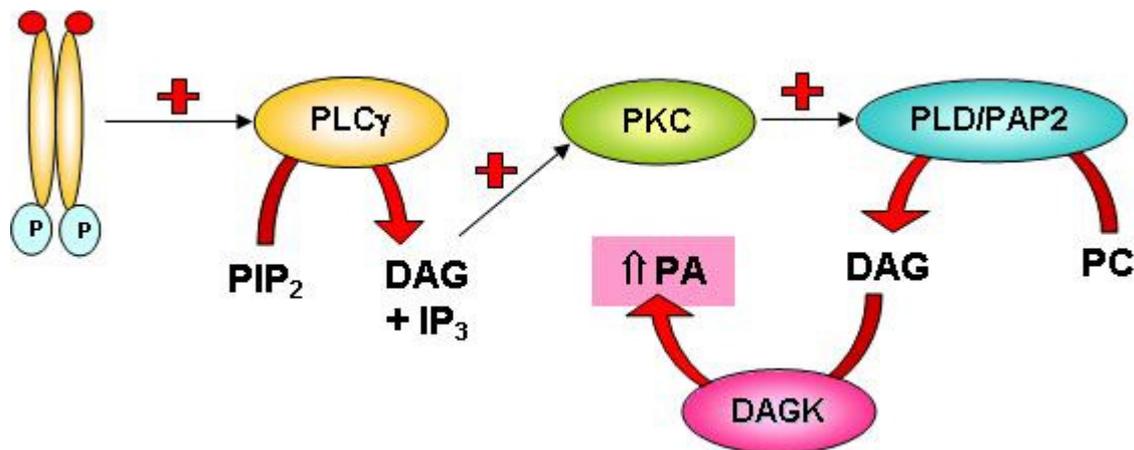
sugiriendo que la vía PC-PLD/PAP2 se encuentra *up-stream* a la activación de la DAGK por la insulina (Fig. 31). Además, en los ensayos realizados con DAG-[<sup>3</sup>H] en ausencia y en presencia del DL-Propranolol, se pudo descartar que la droga afecte de manera directa la actividad de la DAGK (Fig. 32).

Estos datos concuerdan con estudios previos realizados en nuestro laboratorio, en donde se demostró, a partir de PC radiactiva, que la insulina ejerce un efecto estimulador en la actividad de la PC-PLD a los 5 minutos de exposición a la hormona (Salvador y col., 2005).

Los resultados presentados en las figuras 33 y 34, permitieron demostrar que la formación de PA está regulada por la actividad de la PKC, y que el estímulo de la insulina en la formación de PA está ligado a la acción de PKC. Recientemente, ha sido reportado que la PKC está involucrada en los procesos de plasticidad sináptica, aprendizaje y memoria, ya que fosforila los sustratos del receptor de la insulina (IRS), necesario para la señalización hormonal. La insulina puede activar la vía de señalización de PKC, a través del estímulo de PLC $\gamma$ , activable por fosforilación en tirosina, Erk 1/2 MAP quinasa y Src (Nelson y col., 2008).

Los datos en la Fig. 34, indicaron que la acción de la hormona regula la activación de la DAGK, a través de un mecanismo de fosforilación mediado por PKC. Por lo tanto, podría suponerse que el mecanismo de activación hormonal, que origina la autofosforilación del receptor en tirosinas, comenzaría con la activación de la PLC $\gamma$ , dando como productos DAG + IP<sub>3</sub>, estimulando a la PKC. Ésta estimula a la PLD (Morash y col., 2000) generando el DAG a través de la vía PLD/PAP2, resultando en un aumento de PA a partir de la acción de la DAGK, tal como se deduce del empleo de los inhibidores de la vía (apartado 7.4.2).

Esquemáticamente, se podría resumir que el mecanismo de activación de la DAGK por la insulina, producido como consecuencia del aumento de sustrato y a partir de los DAGs generados a partir de la vía PLD/PAP2 es el siguiente:



En concordancia con los resultados presentados en esta tesis, nuestro grupo de trabajo ha reportado que, en sinaptosomas de CC de rata, la insulina estimula la actividad PC-PLD, dependiente de PIP<sub>2</sub> (Salvador y col., 2005).

En nuestro grupo de trabajo, también ha sido demostrada la co-existencia de dos fosfolipasas actuantes sobre PC, la PC-PLD y la PC-PLC, en terminales sinápticos (Mateos y col., 2006). Ha sido reportado que el DAG proveniente de la vía PC-PLC y PC-PLD representa un 75% y un 25% del total de DAG proveniente de la hidrólisis de PC, respectivamente. Esto sugirió que la insulina podría activar también a la vía de PC-PLC, utilizando el inhibidor específico de la PC-PLC, el D609, en presencia de la insulina, no se modificó la activación de la DAGK por la hormona (Fig. 35), indicando que en el mecanismo de activación de la DAGK por la insulina, la vía de formación de DAG a partir de la PC-PLC no estaría involucrada.

Estos resultados indicaron que la insulina estimula la actividad de la DAGK como consecuencia del aumento en los niveles de DAG, generados a partir

de las vías PI-PLC y PLD/PAP2, pudiendo ser un mecanismo por el cual se recuperan los niveles de PA. Dado el rol del DAG como mensajero, la activación de la DAGK puede corresponderse con un mecanismo de control negativo que promueve un cierre de señal. Sin embargo no se puede descartar que el PA formado cumpla, a su vez, con el rol de mensajero (Divecha y Irvine, 1995; Exton, 1994b; Exton, 1997; Jenkins y col., 1994; Knauss y col., 1990). Por otra parte, esta activación podría significar la recuperación de los niveles de  $PIP_2$ , a través del inicio de un mecanismo de resíntesis.

Llamativamente, éste mecanismo de recuperación del PA por acción de la insulina, es reforzado por un mecanismo de activación directa de la DAGK ejercido por la hormona. Esto quedó en evidencia cuando, ofertando DAGs exógenos, lo que evita la modificación en la concentración del sustrato por la activación de las fosfolipasas, la insulina aún estimuló la formación de PA.

Los resultados de las experiencias realizadas con sustratos exógenos (DPG y SAG), indicaron que la insulina estimuló la transformación de ambos sustratos en forma similar (Fig. 40), aunque manteniendo una mayor avidéz por la utilización de SAG. Se podría especular que la insulina ejerce un estímulo sobre la isoforma épsilon de la DAGK, especialmente porque la diferente avidéz por DPG o SAG se mantiene en circunstancia de activación. Esto se deduce no solo por la preferencia en la transformación del sustrato SAG, sino también por la ausencia de inhibición por los inhibidores R59022 y R59949. Ambos son potentes inhibidores de las isoformas calcio-dependientes presentes en cerebro, pero no afectan a la isoforma representante del tipo III,  $DAGK_\epsilon$ , que es insensible (Jiang y col., 2000). Dado que la  $DAGK_\zeta$ , isoforma del tipo IV, también es insensible a éstos

inhibidores y presenta cierta preferencia por sustratos insaturados, no se podía asegurar “a priori” la prevalencia de la isoforma épsilon.

Esto se pudo demostrar a través del empleo de MF mediante anticuerpos secundarios contra anti-DAGK $\epsilon$  y anti-DAGK $\zeta$  marcados con FITC, que en las preparaciones de CC habría un enriquecimiento marcado de la DAGK $\epsilon$  (Fig. 49).

Además, la DAGK $\zeta$  muestra mayor avidez en transformar DOG con respecto a SAG (Thirugnanam y col., 2001). Por el contrario, en nuestras preparaciones pudimos demostrar (Fig. 23), que el SAG es utilizado preferentemente con respecto a DOG y DPG. Aunque también hemos probado la presencia de DAGK $\zeta$  (Fig. 49 y 50), estos resultados confirman la hipótesis de que la actividad enzimática medida en nuestras condiciones de ensayo es la DAGK $\epsilon$ , actuando con distinta avidez por DPG o SAG.

La similitud en la distribución de la actividad en las distintas fracciones subcelulares con uno u otro sustrato, apoyaría también esta hipótesis (Fig. 24). A su vez, la localización subcelular hallada (SPMit) se corresponde con los datos de literatura que indican un enriquecimiento en el retículo endoplásmico (Goto y col., 2008). El contenido minoritario de RE intrasinaptosomal (observación por TEM), así como la señal positiva obtenida con anticuerpos anti-DAGK $\epsilon$  (MF) explican que el escaso porcentaje hallado en la fracción sinaptosomal se debería a la localización en el retículo endoplásmico intrasinaptosomal.

Ha sido reportado que los ratones deficientes en DAGK $\epsilon$  son más resistentes a *shocks* electroconvulsivos, observándose además, una menor activación del ciclo de los fosfoinosítidos y se ha sugerido que esta isoforma podría participar en la actividad sináptica y la plasticidad neuronal (Rodríguez de

Turco y col., 2001). Los datos que estos autores obtienen con respecto a la composición de fosfoinosítidos al comparar contra ratones DAGK $\epsilon$  +/+, indicarían una deficiencia en el aporte de especies con araquidonato, lo que involucra a esta isoforma en la resíntesis de los fosfoinosítidos.

Esta sugerencia ha sido reiteradamente realizada en las diferentes revisiones sobre las isoformas de la DAGK, (Dicu y col., 2007; Goto y col., 2008; Pettitt y Wakelam, 1999) especialmente motivada en 1) la preferencia de sustrato SAG que generaría un PA rico en 18:0-20:4; 2) en la localización subcelular de la enzima, que posicionaría al fosfatidato para ser sustrato de la CDS y 3) en la preferencia que tiene, al menos una de las isoformas de CDS por especies 18:0-20:4 de PA.

En este trabajo de tesis también se evaluaron algunos posibles reguladores que participarían en el mecanismo de activación de la DAGK por insulina, independientemente del aumento de DAG en la membrana por acción de fosfolipasas activadas por la hormona, efecto que denominamos EIF.

Se pudo demostrar que éste mecanismo de activación por la insulina (EIF), es dependiente de la fosforilación en tirosina (Fig. 41). El EDF, a través de la activación de PI-PLC, también requiere la fosforilación en residuos de tirosina (Fig. 29). Además, la activación de PC-PLD por la insulina, medida a través del sustrato específico y en presencia de su activador PIP<sub>2</sub>, solo se observa en presencia de vanadato (Salvador y col., 2005).

En este trabajo de tesis se ha demostrado que el NaF incrementó el estímulo de la insulina a partir de SAG o DPG, en el mismo orden (inserto en Fig. 42). El NaF es un clásico inhibidor general de Ser/Treo fosfatasas (Shenolikar y Nairn, 1991) y podría interpretarse que la desfosforilación a través de Ser/Treo fosfatasas está involucrada en la acción denominada EIF. Sin embargo, la participación de PP1, PP2A y PP2B, en el mecanismo de

activación de DAGK por acción de la insulina fue descartado al utilizar los inhibidores selectivos, el ácido okadaico y la ciclosporina A, quienes no incrementaron el efecto estimulador de insulina (Fig. 44).

Se puede también especular, que el NaF actuaría como un inhibidor de Ser/Treo-fosfatasa, actuantes selectivamente sobre proteínas fosforiladas por la proteína quinasa B (Akt), que a su vez es activada por la insulina a través de la activación de la PI3K. Sin embargo, utilizando el inhibidor selectivo de la vía, el LY294002, tanto en presencia de DPG o de SAG, no se modificó la activación de la DAGK por la insulina (Fig. 45).

El NaF es además un activador de la proteína G, actuando a través de la formación de fluoro aluminato ( $\text{AlF}_4$ ), el que al poseer una estructura similar al  $\text{PO}_4$ , interacciona con el GDP, mimetizando la acción del GTP (Bigay y col., 1985). Se podría especular entonces que el NaF activaría la vía PI-PLC, mediada por la activación de la proteína G. Además, ha sido reportado que los receptores de insulina aislados de membrana plasmática de células grasas humanas, son regulados a través de la proteína G, siendo el RI, estimulado por  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  e inhibido por  $\text{GDP}\beta\text{S}$  y toxina pertussis (Kreuzer y col., 2004). También han reportado que la activación de la proteína G por  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  induce un incremento de 5 veces en la autofosforilación del RI respecto a los niveles basales, y de 3 veces respecto a la autofosforilación inducida por la insulina.

Esta alternativa fue entonces explorada experimentalmente y los resultados se mostraron en la Fig. 45, donde se pudo observar que en presencia de DPG o SAG, el NaF y el  $\text{GTP}\gamma\text{S}$ , aumentan la síntesis de PA en ausencia del estímulo de la insulina, pero no producen ésta activación si se los agrega luego de estímulo hormonal. Esto parece indicar que la activación de la

DAGK por acción de los activadores de proteína G no se ejercería a través de un mecanismo de transducción de señal independiente a la vía transductora de la insulina (como podría ser la activación de alguna vía ligada receptores 7M), ya que el efecto no se potencia luego del estímulo hormonal.

Además, se pudo observar que en ausencia del estímulo hormonal, mientras el NaF y el GTP $\gamma$ S incrementaron la síntesis de PA a partir de DPG (Fig. 46A), la marcación de PIP<sub>2</sub> disminuyó (Fig. 47). Sin embargo, en presencia de SAG, aunque el NaF y el GTP $\gamma$ S incrementaron la síntesis de PA, la marcación de los PIP<sub>2</sub> permaneció invariable (Fig. 47). Estos resultados sugieren que al producirse la hidrólisis de los PIP<sub>2</sub>, a través de la activación de la PI-PLC, aumentaría la actividad de la DAGK $\epsilon$  (que es inhibida por PIP<sub>2</sub>), provocando un aumento en los niveles de PA, tanto a partir de DPG como a partir de SAG, ya que aunque preferentemente utiliza el SAG, también actúa sobre otros DAGs. La desaparición de su regulador negativo induciría la activación de la enzima.

Sólo el 18:0-20:4 PA, podría ser utilizado directamente para la resíntesis de los PI y la ulterior fosforilación de PIP y PIP<sub>2</sub>, manteniendo los niveles de éste lípido, aún en presencia de NaF y GTP $\gamma$ S quienes activarían a PI-PLC. Por el contrario, en presencia de DPG, donde se propicia la formación de di-16:0 PA, la marcación de los PIP<sub>2</sub> disminuye ante la presencia de éstos agentes que inducen su hidrólisis.

Esta modulación de la actividad DAGK por parte de activadores de proteínas G, mediado por PI-PLC o por una autofosforilación del RI (Kreuzer y col., 2004; Schmidt y col., 2000), fue entonces analizada en presencia de la insulina.

Cuando se evaluó el efecto del NaF en presencia de la insulina, se pudo observar (Fig. 48) que la acción hormonal aumentó la formación de PA a partir de ambos sustratos como también la marcación de los polifosfoinosítidos (PIP+PIP<sub>2</sub>). Sin embargo, aunque el NaF provocó un aumento adicional al estímulo de la insulina en la formación de PA, redujo significativamente los niveles de PPIs tanto en presencia de DPG como de SAG.

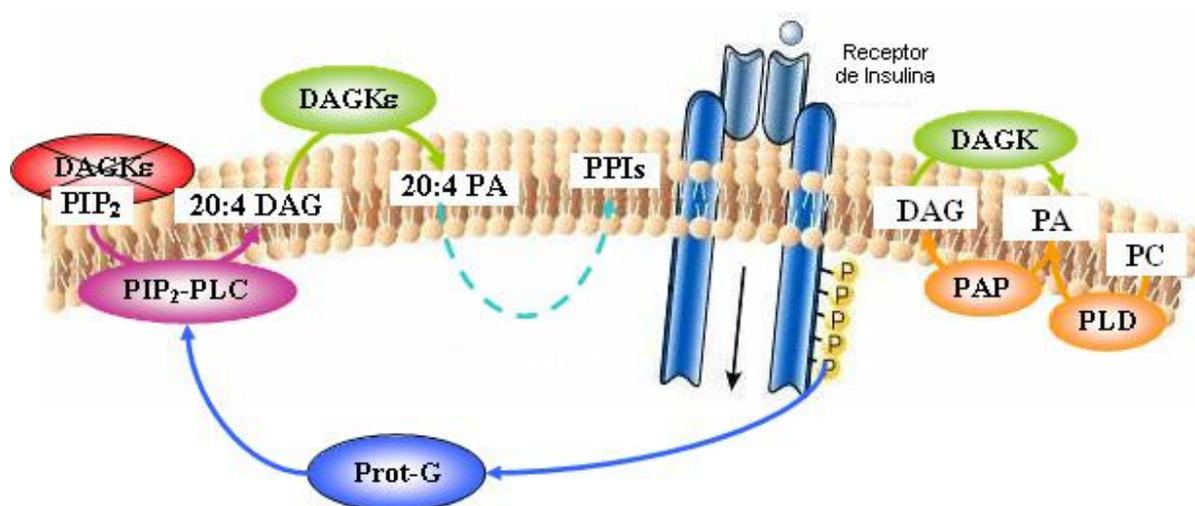
Estos resultados indicarían que a la acción de la hidrólisis del PIP<sub>2</sub>, a través de la activación de la PI-PLC que ejerce la insulina y demostrada en este trabajo de tesis, se le suma un aumento en la resíntesis de los PPIs, que se traduce en una mayor fosforilación, pero que se inhibe en presencia de NaF, el que actuaría inhibiendo dicha resíntesis. Ha sido reportado que en cerebro de rata, en condiciones de estímulo de PI-PLC por acción de carbacol, el NaF inhibe la fosfatidilinositol quinasa (PIK) (Claro y col., 1990), al mismo tiempo que estimula la hidrólisis de los PIP<sub>2</sub> por acción de la PI-PLC, por un mecanismo dependiente de la proteína G (Cockcroft y Taylor, 1987; Litosch, 1987) dando como resultado, una marcada caída en los niveles de PPIs.

La interpretación de los resultados presentados permiten sugerir que esa suma de efectos provoca una marcada reducción en los niveles de PIP<sub>2</sub>, lo que a su vez, provoca como consecuencia un marcado aumento en la actividad de la DAGK $\epsilon$ .

**Conclusión:** Estos resultados sugieren que en los sinaptosomas de CC de rata, la insulina ejerce un efecto estimulatorio en la actividad de la DAGK, a través de dos mecanismos:

- 1) la insulina provoca un aumento de los niveles de DAG a través de la activación de las vías PI-PLC y PLD/PAP2, que generan DAGs de composición insaturada y saturada,
- 2) la insulina provoca un estímulo de la DAGK, independiente de la generación de DAGs. Esta activación responde a una isoforma en particular, la DAGK $\epsilon$ , que preferentemente utiliza SAG como sustrato.

La activación de la PI-PLC, mediada por la acción de la insulina es un mecanismo dependiente de proteína G, que actúa removiendo al PIP<sub>2</sub>. La remoción de los PIP<sub>2</sub>, inhibidor de la DAGK $\epsilon$ , estimula selectivamente ésta isoforma, la cual al generar mayoritariamente a un PA 18:0-20:4 participaría en el inicio temprano de la resíntesis de polifosfoinosítidos. La posibilidad de ser regulada negativamente por PIP<sub>2</sub>, podría también sugerir que la activación de la enzima sería transitoria, como también la reposición de los niveles de PIP<sub>2</sub>. Esta hipótesis puede explicar hallazgos previos que indicaban que el efecto estimulatorio que ejerce la insulina sobre la DAGK, es máximo a cortos períodos de incubación (3-5 min) y se reduce hasta anularse a los 30 min (Salvador y col., 2005).



En el Capítulo III se presentaron los resultados del estudio de la actividad de la DAGK en sinaptosomas de CC y de hipocampo, evaluando los mecanismos de activación de la enzima por acción de la insulina, a fin de comprender el rol de la DAGK en la vía de la señalización mediada por la hormona en el envejecimiento normal del SNC.

Los resultados obtenidos al analizar el contenido de DAGs de sinaptosomas de CC de animales seniles, comparándolos con los de animales adultos, indicaron que el nivel de DAGs disponibles en estas membranas es mayor. Este resultado coincide con una menor actividad de la DAGK, hallada en estas membranas cuando se utilizó como sustrato radiomarcado el DAG proveniente de retina (exógeno) (Salvador y col., 2005), además de encontrarse aumentada la vía PLD/PAP2 (Pasquare y col., 2001). En este trabajo se sugería que, como consecuencia de este desbalance metabólico, podrían hallarse alterados dichos niveles.

La participación del hipocampo en los procesos de memoria y aprendizaje y el deterioro de los mismos en el envejecimiento, explican el interés en su estudio. Cuando se analizó la actividad basal de la DAGK de sinaptosomas de hipocampo de ratas adultas, se pudo demostrar que la DAGK en estas membranas, al igual que en las de CC, utiliza ávidamente el DAG de composición en acilos 18:0-20:4, siendo la formación de PA a partir de DPG y SAG de 16,887 y 70,613 pmol/ mg de prot x 5 min, respectivamente. Los resultados indicaron que la capacidad de transformación de DAGs exógenos respecto a los DAGs endógenos, en los terminales sinápticos de hipocampo fue ligeramente superior a lo hallado en CC. Sin embargo, esta transformación mantiene la preferencia en la utilización de SAG respecto a DPG, sugiriendo que en estas condiciones se favoreció la medida de una actividad DAGK $\epsilon$ .

Para estudiar el efecto del envejecimiento normal en la actividad de la DAGK, se consideró a la misma actuando sobre DAGs endógenos y exógenos (DPG y SAG). Se observó que la actividad de la DAGK basal (ausencia de insulina) en ausencia de DAGs exógenos, se encontraba disminuida en los sinaptosomas de CC de los animales seniles. Llamativamente, esto no ocurrió en los sinaptosomas de hipocampo. Por otra parte, tanto en los sinaptosomas de CC como en los de hipocampo, la actividad DAGK basal de ratas seniles a partir de DAGs insaturados (SAG), se halló disminuida en relación a las adultas, sin embargo la utilización de DAGs saturados (DPG) fue similar al valor de los adultos, tanto en hipocampo como en CC.

Estos datos indicarían un deterioro particular en la transformación de DAGs insaturados, coincidente con hallazgos previos donde se utilizaba como sustrato de DAGK, a DAGs de composición preferentemente insaturada (Salvador y col., 2005).

Cuando se evaluó la acción de la insulina en los sinaptosomas de animales adultos, se encontró que la hormona estimula la actividad de la DAGK a partir de DPG de la misma forma en CC e hipocampo. Sin embargo, en presencia de SAG, el estímulo fue superior en hipocampo respecto a CC.

Ha sido reportado que en los cerebros de pacientes con la enfermedad de Alzheimer (EA), se observan menores niveles de fosfoinosítidos que en los cerebros normales (Stokes y Hawthorne, 1987). En trabajos recientes realizados en corteza prefrontal de cerebros de este tipo de pacientes (EA) se demostró que aunque la expresión y actividad de la PI-PLC o Gq/11 son similares a los hallados en sujetos sanos, la activación por GTP $\gamma$ S ó carbacol produce una menor hidrólisis (Jope y col., 1994). En un modelo de envejecimiento normal (ratas de 24-26 meses) ha sido reportada la

reducción en la hidrólisis de fosfoinosítidos de CC e hipocampo, inducida por la activación muscarínica, siendo atribuida al desacople de la vía transductora que involucra a la PI-PLC (Ayyagari y col., 1998). Un hallazgo interesante, realizado en áreas específicas del hipocampo de ratas envejecidas y con probado déficit cognitivo, indicaría una importante reducción en la resíntesis de los fosfoinosítidos, medida a través de la incorporación de [<sup>3</sup>H]-citidina en [<sup>3</sup>H]-CDP-DAG (Nicolle y col., 2001).

Dado el rol propuesto para DAGK $\epsilon$  en la resíntesis de los fosfoinosítidos y teniendo en cuenta la función de la insulina como un agente neuroprotector, estos hallazgos sugieren que en el envejecimiento, la insulina produce una potenciación sobre la actividad de la DAGK $\epsilon$ , probablemente por un mecanismo de desregulación negativa ejercida por los bajos niveles de PIP<sub>2</sub>, favoreciendo así una mayor actividad de ésta isoforma, resultando un mecanismo compensatorio para la restauración de los niveles de fosfoinosítidos.

Existen evidencias experimentales realizadas "in vivo", en adultos humanos, que indican que en condiciones controladas de glucemia normal, la infusión sistémica de insulina provoca un mejoramiento de actividades de memoria verbal y atención selectiva (Kern y col., 2001). Otras estrategias, como la instilación nasal del péptido, que evitan las modificaciones de los niveles de glucosa o insulina en sangre periférica, han permitido detectar mejoras en tareas cognitivas evocadas por estímulos auditivos (Kern y col., 1999). Numerosas experiencias clínicas indican que pacientes seniles y enfermos con EA, responden eficientemente a insulina con respecto a los efectos benéficos de la hormona en el mejoramiento de tareas de memoria (Craft y col., 1999; Craft y col., 2000).

Aunque hasta el momento no han sido esclarecidos los mecanismos precisos que implican comprender el rol de la insulina en el aprendizaje y la memoria, como también su rol en la atenuación de los efectos que producen los desórdenes neurodegenerativos sobre estos procesos, este trabajo de tesis aporta datos que podrían, en parte, esclarecer algunos aspectos moleculares de la acción de la insulina a nivel cerebral y de su importancia como modulador de señales que han sido deterioradas por el envejecimiento.

### **En resumen:**

- 1) La insulina a nivel sináptico y en animales adultos, desencadena una secuencia de eventos tempranos, tirosina quinasa dependientes, que se inician en la producción de DAGs provenientes de fosfoinosítidos y fosfatidilcolina.
- 2) Dicha producción es controlada a través de la formación de ácido fosfatídico por la actividad DAGK, sirviendo este mecanismo para la regulación de los niveles de DAGs potenciales activadores de proteínas con dominios C1.
- 3) Existe en terminales sinápticos de CC e hipocampo una actividad DAGK $\epsilon$  que promueve una activa transformación de DAGs provenientes de fosfoinosítidos.
- 4) La insulina activa a dicha isoforma promoviendo la formación de un PA de composición potencialmente apta para ser precursor directo de los fosfoinosítidos.
- 5) La activación de esta isoforma por insulina podría desencadenarse por activación de una PI-PLC y disminución de fosfoinosítidos, acciones

también provocadas por la exposición de los terminales sinápticos a activadores de proteínas G.

- 6) En ausencia de la hormona la actividad DAGK actuante sobre SAG se halla disminuida en los terminales sinápticos de CC e hipocampo de animales seniles.
- 7) La acción de la insulina, respecto a la activación de la DAGK $\epsilon$  y a la formación de un PA potencialmente apto para ser precursor de fosfoinosítidos, se encuentra favorecido en hipocampo y particularmente en los animales seniles.
- 8) Este efecto de la hormona sobre la acción de la DAGK $\epsilon$  podría ser un mecanismo que resulta compensatorio en la regulación de la resíntesis de los fosfoinosítidos, explicando en parte el rol de la insulina como agente neuroprotector.

1. Akiyama,T. and Ogawara,H. (1991). Use and specificity of genistein as inhibitor of protein-tyrosine kinases. *Methods Enzymol.* *201*, 362-370.
2. 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*, 201-212.
3. Arvidson,G.A. (1968). Structural and metabolic heterogeneity of rat liver glycerophosphatides. *Eur. J. Biochem.* *4*, 478-486.
4. Ayyagari,P.V., Gerber,M., Joseph,J.A., and Crews,F.T. (1998). Uncoupling of muscarinic cholinergic phosphoinositide signals in senescent cerebral cortical and hippocampal membranes. *Neurochem. Int.* *32*, 107-115.
5. Baum,A.E., Akula,N., Cabanero,M., Cardona,I., Corona,W., Klemens,B., Schulze,T.G., Cichon,S., Rietschel,M., Nothen,M.M., Georgi,A., Schumacher,J., Schwarz,M., Abou,J.R., Hofels,S., Propping,P., Satagopan,J., tera-Wadleigh,S.D., Hardy,J., and McMahon,F.J. (2008). A genome-wide association study implicates diacylglycerol kinase eta (DGKH) and several other genes in the etiology of bipolar disorder. *Mol. Psychiatry* *13*, 197-207.
6. Bialojan,C., Ruegg,J.C., and Takai,A. (1988). Effects of okadaic acid on isometric tension and myosin phosphorylation of chemically skinned guinea-pig taenia coli. *J. Physiol* *398*, 81-95.
7. Biessels,G.J., van der Heide,L.P., Kamal,A., Bleys,R.L., and Gispen,W.H. (2002). Ageing and diabetes: implications for brain function. *Eur. J. Pharmacol.* *441*, 1-14.
8. Bigay,J., Deterre,P., Pfister,C., and Chabre,M. (1985). Fluoroaluminates activate transducin-GDP by mimicking the gamma-phosphate of GTP in its binding site. *FEBS Lett.* *191*, 181-185.

9. 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*, 8137-8144.
10. Brown,W.J., Sullivan,T.R., and Greenspan,P. (1992). Nile red staining of lysosomal phospholipid inclusions. *Histochemistry* *97*, 349-354.
11. 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*, 10230-10236.
12. 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*, 4790-4796.
13. Carman,G.M. and Zeimet,G.M. (1996). Regulation of phospholipid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *271*, 13293-13296.
14. Castano,E.M. and Frangione,B. (1995). Non-Alzheimer's disease amyloidoses of the nervous system. *Curr. Opin. Neurol.* *8*, 279-285.
15. Chakraborty,G., Reddy,R., Drivas,A., and Ledeen,R.W. (2003). Interleukin-2 receptors and interleukin-2-mediated signaling in myelin: activation of diacylglycerol kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Neuroscience* *122*, 967-973.
16. Claro,E., Wallace,M.A., and Fain,J.N. (1990). Dual effect of fluoride on phosphoinositide metabolism in rat brain cortex. Stimulation of phospholipase C and inhibition of polyphosphoinositide synthesis. *Biochem. J.* *268*, 733-737.

17. Clipstone, N.A., Fiorentino, D.F., and Crabtree, G.R. (1994). Molecular analysis of the interaction of calcineurin with drug-immunophilin complexes. *J. Biol. Chem.* *269*, 26431-26437.
18. Cockcroft, S. (1992). G-protein-regulated phospholipases C, D and A2-mediated signalling in neutrophils. *Biochim. Biophys. Acta* *1113*, 135-160.
19. Cockcroft, S. and Taylor, J.A. (1987). Fluoroaluminates mimic guanosine 5'-[gamma-thio]triphosphate in activating the polyphosphoinositide phosphodiesterase of hepatocyte membranes. Role for the guanine nucleotide regulatory protein Gp in signal transduction. *Biochem. J.* *241*, 409-414.
20. 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.
21. Cotman, C.W. (1974). Isolation of synaptosomal and synaptic plasma membrane fractions. *Methods Enzymol.* *31*, 445-452.
22. Craft, S., Asthana, S., Newcomer, J.W., Wilkinson, C.W., Matos, I.T., Baker, L.D., Cherrier, M., Lofgreen, C., Latendresse, S., Petrova, A., Plymate, S., Raskind, M., Grimwood, K., and Veith, R.C. (1999). Enhancement of memory in Alzheimer disease with insulin and somatostatin, but not glucose. *Arch. Gen. Psychiatry* *56*, 1135-1140.
23. Craft, S., Asthana, S., Schellenberg, G., Baker, L., Cherrier, M., Boyt, A.A., Martins, R.N., Raskind, M., Peskind, E., and Plymate, S. (2000). Insulin effects on glucose metabolism, memory, and plasma amyloid precursor protein in Alzheimer's disease differ according to apolipoprotein-E genotype. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *903*, 222-228.

24. Craft,S., Peskind,E., Schwartz,M.W., Schellenberg,G.D., Raskind,M., and Porte,D., Jr. (1998). Cerebrospinal fluid and plasma insulin levels in Alzheimer's disease: relationship to severity of dementia and apolipoprotein E genotype. *Neurology* 50, 164-168.
25. Craft,S. and Watson,G.S. (2004). Insulin and neurodegenerative disease: shared and specific mechanisms. *Lancet Neurol.* 3, 169-178.
26. DALZIEL,K. and O'BRIEN,J.R. (1957). Spectrokinetic studies of the reaction of hydrogen peroxide with haemoglobin in dithionite solutions. *Biochem. J.* 67, 124-136.
27. de Chaffoy de Courcelles DC, Roevens,P., and Van,B.H. (1985). R 59 022, a diacylglycerol kinase inhibitor. Its effect on diacylglycerol and thrombin-induced C kinase activation in the intact platelet. *J. Biol. Chem.* 260, 15762-15770.
28. 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, 44763-44774.
29. Dicu,A.O., Topham,M.K., Ottaway,L., and Epanand,R.M. (2007). Role of the hydrophobic segment of diacylglycerol kinase epsilon. *Biochemistry* 46, 6109-6117.
30. Dillon,D.A., Chen,X., Zeimetz,G.M., Wu,W.I., Waggoner,D.W., Dewald,J., Brindley,D.N., and Carman,G.M. (1997). Mammalian Mg<sup>2+</sup>-independent phosphatidate phosphatase (PAP2) displays diacylglycerol pyrophosphate phosphatase activity. *J. Biol. Chem.* 272, 10361-10366.
31. Ding,L., Bunting,M., Topham,M.K., McIntyre,T.M., Zimmerman,G.A., and Prescott,S.M. (1997). Alternative splicing of the human diacylglycerol kinase zeta gene in muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 5519-5524.

32. Ding,L., McIntyre,T.M., Zimmerman,G.A., and Prescott,S.M. (1998a). The cloning and developmental regulation of murine diacylglycerol kinase zeta. *FEBS Lett.* *429*, 109-114.
33. Ding,L., Traer,E., McIntyre,T.M., Zimmerman,G.A., and Prescott,S.M. (1998b). The cloning and characterization of a novel human diacylglycerol kinase, DGKiota. *J. Biol. Chem.* *273*, 32746-32752.
34. Divecha,N. and Irvine,R.F. (1995). Phospholipid signaling. *Cell* *80*, 269-278.
35. Donchenko,V., Zannetti,A., and Baldini,P.M. (1994). Insulin-stimulated hydrolysis of phosphatidylcholine by phospholipase C and phospholipase D in cultured rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta* *1222*, 492-500.
36. Eichhorn,J., Kayali,A.G., Austin,D.A., and Webster,N.J. (2001). Insulin activates phospholipase C-gamma1 via a PI-3 kinase dependent mechanism in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *282*, 615-620.
37. English,D. (1996). Phosphatidic acid: a lipid messenger involved in intracellular and extracellular signalling. *Cell Signal.* *8*, 341-347.
38. Epand,R.M. and Topham,M.K. (2007). Measurement of mammalian diacylglycerol kinase activity in vitro and in cells. *Methods Enzymol.* *434*, 293-304.
39. Exton,J.H. (1997). Phospholipase D: enzymology, mechanisms of regulation, and function. *Physiol Rev.* *77*, 303-320.
40. Exton,J.H. (1994b). Messenger molecules derived from membrane lipids. *Curr. Opin. Cell Biol.* *6*, 226-229.

41. Exton, J.H. (1994a). Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction. *Biochim. Biophys. Acta* *1212*, 26-42.
42. Faenza, I., Billi, A.M., Follo, M.Y., Fiume, R., Martelli, A.M., Cocco, L., and Manzoli, L. (2005). Nuclear phospholipase C signaling through type 1 IGF receptor and its involvement in cell growth and differentiation. *Anticancer Res.* *25*, 2039-2041.
43. Fanani, M.L., Topham, M.K., Walsh, J.P., and Epan, R.M. (2004). Lipid modulation of the activity of diacylglycerol kinase alpha- and zeta-isoforms: activation by phosphatidylethanolamine and cholesterol. *Biochemistry* *43*, 14767-14777.
44. Fang, Y., Vilella-Bach, M., Bachmann, R., Flanigan, A., and Chen, J. (2001). Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science* *294*, 1942-1945.
45. Farese, R.V., Sajan, M.P., and Standaert, M.L. (2005). Insulin-sensitive protein kinases (atypical protein kinase C and protein kinase B/Akt): actions and defects in obesity and type II diabetes. *Exp. Biol. Med. (Maywood.)* *230*, 593-605.
46. Figlewicz, D.P. and Szot, P. (1991). Insulin stimulates membrane phospholipid metabolism by enhancing endogenous alpha 1-adrenergic activity in the rat hippocampus. *Brain Res.* *550*, 101-107.
47. 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.
48. Fox, M.A., Chen, R.S., and Holmes, C.S. (2003). Gender differences in memory and learning in children with insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) over a 4-year follow-up interval. *J. Pediatr. Psychol.* *28*, 569-578.

49. 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*, 423-438.
50. Fu,T., Okano,Y., Hagiwara,M., Hidaka,H., and Nozawa,Y. (1989). Bradykinin-induced translocation of protein kinases C in neuroblastoma NCB-20 cell: dependence on 1,2-diacylglycerol content and free calcium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *162*, 1279-1286.
51. 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*, 8472-8480.
52. Gispen,W.H. and Biessels,G.J. (2000). Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends Neurosci.* *23*, 542-549.
53. Giusto,N.M. and Bazan,N.G. (1979). Phospholipids and acylglycerols biosynthesis and  $^{14}\text{CO}_2$  production from [ $^{14}\text{C}$ ]glycerol in the bovine retina: the effects of incubation time, oxygen and glucose. *Exp. Eye Res.* *29*, 155-168.
54. Giusto,N.M. and Ilincheta de Boschero,M.G. (1986). Synthesis of polyphosphoinositides in vertebrate photoreceptor membranes. *Biochim. Biophys. Acta* *877*, 440-446.
55. 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*, 13042-13046.

56. 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.
57. 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*, 11196-11201.
58. 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*, 7598-7602.
59. Goto,K. and Kondo,H. (1999a). Diacylglycerol kinase in the central nervous system--molecular heterogeneity and gene expression. *Chem. Phys. Lipids* *98*, 109-117.
60. Goto,K. and Kondo,H. (1999b). [Diacylglycerol kinase: molecular diversity and gene expression in central nervous system]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* *44*, 976-982.
61. Greenspan,P. and Fowler,S.D. (1985). Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red. *J. Lipid Res.* *26*, 781-789.
62. Greenspan,P., Mayer,E.P., and Fowler,S.D. (1985). Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J. Cell Biol.* *100*, 965-973.
63. Griffin,H.D., Sykes,M., and Hawthorne,J.N. (1980). Effects of neomycin on calcium and polyphosphoinositide metabolism of guinea pig synaptosomes. *J. Neurochem.* *34*, 750-752.
64. Havrankova,J., Schmechel,D., Roth,J., and Brownstein,M. (1978). Identification of insulin in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *75*, 5737-5741.

65. Holmes,C.F., Luu,H.A., Carrier,F., and Schmitz,F.J. (1990). Inhibition of protein phosphatases-1 and -2A with acanthifolicin. Comparison with diarrhetic shellfish toxins and identification of a region on okadaic acid important for phosphatase inhibition. *FEBS Lett.* *270*, 216-218.
66. Hong,M. and Lee,V.M. (1997). Insulin and insulin-like growth factor-1 regulate tau phosphorylation in cultured human neurons. *J. Biol. Chem.* *272*, 19547-19553.
67. Hornia,A., Lu,Z., Sukezane,T., Zhong,M., Joseph,T., Frankel,P., and Foster,D.A. (1999). Antagonistic effects of protein kinase C alpha and delta on both transformation and phospholipase D activity mediated by the epidermal growth factor receptor. *Mol. Cell Biol.* *19*, 7672-7680.
68. Houssa,B., Schaap,D., van der,W.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*, 10422-10428.
69. Hoyer,S. (2002). The aging brain. Changes in the neuronal insulin/insulin receptor signal transduction cascade trigger late-onset sporadic Alzheimer disease (SAD). A mini-review. *J. Neural Transm.* *109*, 991-1002.
70. Hoyer,S. (1998). Is sporadic Alzheimer disease the brain type of non-insulin dependent diabetes mellitus? A challenging hypothesis. *J. Neural Transm.* *105*, 415-422.
71. Hurley,J.H., Newton,A.C., Parker,P.J., Blumberg,P.M., and Nishizuka,Y. (1997). Taxonomy and function of C1 protein kinase C homology domains. *Protein Sci.* *6*, 477-480.
72. 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*, 39870-39881.

73. Isaacks,R., Harkness,D., Sampsell,R., Adler,J., Roth,S., Kim,C., and Goldman,P. (1977). Studies on avian erythrocyte metabolism. Inositol tetrakisphosphate: the major phosphate compound in the erythrocytes of the ostrich (*Struthio camelus camelus*). *Eur. J. Biochem.* 77, 567-574.
74. 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, 23317-23326.
75. 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, 35959-35967.
76. 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, 11547-11554.
77. Jiang,Y., Sakane,F., Kanoh,H., and Walsh,J.P. (2000). Selectivity of the diacylglycerol kinase inhibitor 3-[2-(4-[bis-(4-fluorophenyl)methylene]-1-piperidinyl)ethyl]-2, 3-dihydro-2-thioxo-4(1H)quinazolinone (R59949) among diacylglycerol kinase subtypes. *Biochem. Pharmacol.* 59, 763-772.
78. Johnson, N.L. y Kotz, S. (1969). *Distributions in Statistics.* 29.
79. 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, 20845-20850.
80. 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, 15530-15538.

81. Jope,R.S., Song,L., Li,X., and Powers,R. (1994). Impaired phosphoinositide hydrolysis in Alzheimer's disease brain. *Neurobiol. Aging* 15, 221-226.
82. 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, 18492-18498.
83. Kern,W., Born,J., Schreiber,H., and Fehm,H.L. (1999). Central nervous system effects of intranasally administered insulin during euglycemia in men. *Diabetes* 48, 557-563.
84. Kern,W., Peters,A., Fruehwald-Schultes,B., Deininger,E., Born,J., and Fehm,H.L. (2001). Improving influence of insulin on cognitive functions in humans. *Neuroendocrinology* 74, 270-280.
85. Klauck,T.M., Xu,X., Mousseau,B., and Jaken,S. (1996). Cloning and characterization of a glucocorticoid-induced diacylglycerol kinase. *J. Biol. Chem.* 271, 19781-19788.
86. 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, 14457-14463.
87. Kohyama-Koganeya,A., Watanabe,M., and Hotta,Y. (1997). Molecular cloning of a diacylglycerol kinase isozyme predominantly expressed in rat retina. *FEBS Lett.* 409, 258-264.
88. Kreuzer,J., Nurnberg,B., and Krieger-Brauer,H.I. (2004). Ligand-dependent autophosphorylation of the insulin receptor is positively regulated by Gi-proteins. *Biochem. J.* 380, 831-836.
89. Kubota,N., Terauchi,Y., Tobe,K., Yano,W., Suzuki,R., Ueki,K., Takamoto,I., Satoh,H., Maki,T., Kubota,T., Moroi,M., Okada-Iwabu,M., Ezaki,O., Nagai,R., Ueta,Y., Kadowaki,T., and Noda,T. (2004).

Insulin receptor substrate 2 plays a crucial role in beta cells and the hypothalamus. *J. Clin. Invest* *114*, 917-927.

90. Lawlor, M.A. and Alessi, D.R. (2001). PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J. Cell Sci.* *114*, 2903-2910.

91. 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 isoforms and other acidic lipids. *Biochem. J.* *304* ( Pt 3), 1001-1008.

92. Litosch, I. (1987). Guanine nucleotide and NaF stimulation of phospholipase C activity in rat cerebral-cortical membranes. Studies on substrate specificity. *Biochem. J.* *244*, 35-40.

93. 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*, 1644-1647.

94. Lopez, S.M., Morelli, L., Castano, E.M., Soto, E.F., and Pasquini, J.M. (2000). Defective ubiquitination of cerebral proteins in Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* *62*, 302-310.

95. 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*, 265-275.

96. 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*, 551-561.

97. Luo, B., Regier, D.S., Prescott, S.M., and Topham, M.K. (2004). Diacylglycerol kinases. *Cell Signal.* *16*, 983-989.

98. Lupien, S.B., Bluhm, E.J., and Ishii, D.N. (2003). Systemic insulin-like growth factor-I administration prevents cognitive impairment in diabetic rats, and brain IGF regulates learning/memory in normal adult rats. *J. Neurosci. Res.* *74*, 512-523.
99. Lykidis, A., Jackson, P.D., Rock, C.O., and Jackowski, S. (1997). The role of CDP-diacylglycerol synthetase and phosphatidylinositol synthase activity levels in the regulation of cellular phosphatidylinositol content. *J. Biol. Chem.* *272*, 33402-33409.
100. Lykidis, A., Mougios, V., and Arzoglou, P. (1995). Kinetics of the two-step hydrolysis of triacylglycerol by pancreatic lipases. *Eur. J. Biochem.* *230*, 892-898.
101. Lykidis, A., Mougios, V., and Arzoglou, P. (1994). Pancreatic lipase assays with triglycerides as substrate: contribution of each sequential reaction to product formation. *Clin. Chem.* *40*, 2053-2056.
102. Marmiroli, S., Ognibene, A., Bavelloni, A., Cinti, C., Cocco, L., and Maraldi, N.M. (1994). Interleukin 1 alpha stimulates nuclear phospholipase C in human osteosarcoma SaOS-2 cells. *J. Biol. Chem.* *269*, 13-16.
103. Martelli, A.M., Tabellini, G., Bortul, R., Manzoli, L., Bareggi, R., Baldini, G., Grill, V., Zweyer, M., Narducci, P., and Cocco, L. (2000). Enhanced nuclear diacylglycerol kinase activity in response to a mitogenic stimulation of quiescent Swiss 3T3 cells with insulin-like growth factor I. *Cancer Res.* *60*, 815-821.
104. Masters, B.A., Shemer, J., Judkins, J.H., Clarke, D.W., Le, R.D., and Raizada, M.K. (1987). Insulin receptors and insulin action in dissociated brain cells. *Brain Res.* *417*, 247-256.
105. Mateos, M.V., Uranga, R.M., Salvador, G.A., and Giusto, N.M. (2006). Coexistence of phosphatidylcholine-specific phospholipase C and phospholipase D activities in rat cerebral cortex synaptosomes. *Lipids* *41*, 273-280.

106. Merida,I., vila-Flores,A., and Merino,E. (2008). Diacylglycerol kinases: at the hub of cell signalling. *Biochem. J.* *409*, 1-18.
107. Morash,S.C., Byers,D.M., and Cook,H.W. (2000). Activation of phospholipase D by PKC and GTPgammaS in human neuroblastoma cells overexpressing MARCKS. *Biochim. Biophys. Acta* *1487*, 177-189.
108. Moritz,A., De Graan,P.N., Gispen,W.H., and Wirtz,K.W. (1992). Phosphatidic acid is a specific activator of phosphatidylinositol-4-phosphate kinase. *J. Biol. Chem.* *267*, 7207-7210.
109. MORRISON,W.R. and SMITH,L.M. (1964). PREPARATION OF FATTY ACID METHYL ESTERS AND DIMETHYLACETALS FROM LIPIDS WITH BORON FLUORIDE--METHANOL. *J. Lipid Res.* *5*, 600-608.
110. 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*, 34364-34372.
111. 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*, 302-316.
112. Nelson DL y Cox MM . (2005). *Molecular mechanisms of signal transduction.* 421-479.
113. Nelson,T.J., Sun,M.K., Hongpaisan,J., and Alkon,D.L. (2008). Insulin, PKC signaling pathways and synaptic remodeling during memory storage and neuronal repair. *Eur. J. Pharmacol.* *585*, 76-87.
114. Newton,A.C. (1997). Regulation of protein kinase C. *Curr. Opin. Cell Biol.* *9*, 161-167.

115. Nichols,R.A., Suplick,G.R., and Brown,J.M. (1994). Calcineurin-mediated protein dephosphorylation in brain nerve terminals regulates the release of glutamate. *J. Biol. Chem.* *269*, 23817-23823.
116. Nicolle,M.M., Gallagher,M., and McKinney,M. (2001). Visualization of muscarinic receptor-mediated phosphoinositide turnover in the hippocampus of young and aged, learning-impaired Long Evans rats. *Hippocampus* *11*, 741-746.
117. Nishizuka,Y. (1995). Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* *9*, 484-496.
118. Nishizuka,Y. (1992). Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* *258*, 607-614.
119. Nobe,K., Miyatake,M., Nobe,H., Sakai,Y., Takashima,J., and Momose,K. (2004). Novel diacylglycerol kinase inhibitor selectively suppressed an U46619-induced enhancement of mouse portal vein contraction under high glucose conditions. *Br. J. Pharmacol.* *143*, 166-178.
120. Oka,M., Hitomi,T., Okada,T., Nakamura,S.S., Nagai,H., Ohba,M., Kuroki,T., Kikkawa,U., and Ichihashi,M. (2002). Dual regulation of phospholipase D1 by protein kinase C alpha in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *294*, 1109-1113.
121. Pasquare,S.J., Ilincheta de Boschero,M.G., and Giusto,N.M. (2001). Aging promotes a different phosphatidic acid utilization in cytosolic and microsomal fractions from brain and liver. *Exp. Gerontol.* *36*, 1387-1401.
122. 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*, 36181-36186.

123. Raizada,M.K., Shemer,J., Judkins,J.H., Clarke,D.W., Masters,B.A., and LeRoith,D. (1988). Insulin receptors in the brain: structural and physiological characterization. *Neurochem. Res.* *13*, 297-303.
124. Reibman,J., Korchak,H.M., Vosshall,L.B., Haines,K.A., Rich,A.M., and Weissmann,G. (1988). Changes in diacylglycerol labeling, cell shape, and protein phosphorylation distinguish "triggering" from "activation" of human neutrophils. *J. Biol. Chem.* *263*, 6322-6328.
125. Rivera,E.J., Goldin,A., Fulmer,N., Tavares,R., Wands,J.R., and de la Monte,S.M. (2005). Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: link to brain reductions in acetylcholine. *J. Alzheimers. Dis.* *8*, 247-268.
126. 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*, 4740-4745.
127. Ron,D. and Kazanietz,M.G. (1999). New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *FASEB J.* *13*, 1658-1676.
128. Saito,S., Goto,K., Tonosaki,A., and Kondo,H. (1997). Gene cloning and characterization of CDP-diacylglycerol synthase from rat brain. *J. Biol. Chem.* *272*, 9503-9509.
129. 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*, 8394-8401.

130. 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*, 43519-43526.
131. 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*, 345-348.
132. Salvador,G.A., Ilincheta de Boschero,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*, 244-252.
133. Salvador,G.A., Pasquare,S.J., Ilincheta de Boschero,M.G., and Giusto,N.M. (2002). Differential modulation of phospholipase D and phosphatidate phosphohydrolase during aging in rat cerebral cortex synaptosomes. *Exp. Gerontol.* *37*, 543-552.
134. Sauter,A., Goldstein,M., Engel,J., and Ueta,K. (1983). Effect of insulin on central catecholamines. *Brain Res.* *260*, 330-333.
135. Schaap,D., de,W.J., van der,W.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*, 151-158.
136. Schacht,J. (1976). Inhibition by neomycin of polyphosphoinositide turnover in subcellular fractions of guinea-pig cerebral cortex in vitro. *J. Neurochem.* *27*, 1119-1124.
137. Schmidt,M., Frings,M., Mono,M.L., Guo,Y., Weernink,P.A., Evellin,S., Han,L., and Jakobs,K.H. (2000). G protein-coupled receptor-induced sensitization of phospholipase C stimulation by receptor tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* *275*, 32603-32610.

138. Sciorra, V.A. and Morris, A.J. (1999). Sequential actions of phospholipase D and phosphatidic acid phosphohydrolase 2b generate diglyceride in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* *10*, 3863-3876.
139. Segel, I. (1993). *Enzyme kinetics*.
140. Shechter, Y. (1990). Insulin-mimetic effects of vanadate. Possible implications for future treatment of diabetes. *Diabetes* *39*, 1-5.
141. Shenolikar, S. and Nairn, A.C. (1991). Protein phosphatases: recent progress. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* *23*, 1-121.
142. Steen, E., Terry, B.M., Rivera, E.J., Cannon, J.L., Neely, T.R., Tavares, R., Xu, X.J., Wands, J.R., and de la Monte, S.M. (2005). Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes? *J. Alzheimers. Dis.* *7*, 63-80.
143. Stokes, C.E. and Hawthorne, J.N. (1987). Reduced phosphoinositide concentrations in anterior temporal cortex of Alzheimer-diseased brains. *J. Neurochem.* *48*, 1018-1021.
144. Swarup, G., Cohen, S., and Garbers, D.L. (1982). Inhibition of membrane phosphotyrosyl-protein phosphatase activity by vanadate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *107*, 1104-1109.
145. Takai, Y., Sasaki, T., and Matozaki, T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev.* *81*, 153-208.
146. 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*, 275-285.

147. 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*, 10237-10241.
148. Thirugnanam,S., Topham,M.K., and Epan,R.M. (2001). Physiological implications of the contrasting modulation of the activities of the epsilon- and zeta-isoforms of diacylglycerol kinase. *Biochemistry* *40*, 10607-10613.
149. Topham,M.K. (2006). Signaling roles of diacylglycerol kinases. *J. Cell Biochem.* *97*, 474-484.
150. 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.
151. Topham,M.K. and Prescott,S.M. (1999). Mammalian diacylglycerol kinases, a family of lipid kinases with signaling functions. *J. Biol. Chem.* *274*, 11447-11450.
152. 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*, 982-985.
153. Uranga,R.M., Mateos,M.V., Giusto,N.M., and Salvador,G.A. (2007). Activation of phosphoinositide-3 kinase/Akt pathway by FeSO<sub>4</sub> in rat cerebral cortex synaptic endings. *J. Neurosci. Res.* *85*, 2924-2932.
154. 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*, 205-221.

155. Vinals,F., Camps,M., Testar,X., Palacin,M., and Zorzano,A. (1997). Effect of cations on the tyrosine kinase activity of the insulin receptor: inhibition by fluoride is magnesium dependent. *Mol. Cell Biochem.* *171*, 69-73.
156. Vlahos,C.J., Matter,W.F., Hui,K.Y., and Brown,R.F. (1994). A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J. Biol. Chem.* *269*, 5241-5248.
157. 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*, 28647-28653.
158. Walsh,J.P., Suen,R., Lemaitre,R.N., and Glomset,J.A. (1994). Arachidonoyl-diacylglycerol kinase from bovine testis. Purification and properties. *J. Biol. Chem.* *269*, 21155-21164.
159. Wattenberg,B.W., Pitson,S.M., and Raben,D.M. (2006). The sphingosine and diacylglycerol kinase superfamily of signaling kinases: localization as a key to signaling function. *J. Lipid Res.* *47*, 1128-1139.
160. 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.
161. Yeo,E.J. and Exton,J.H. (1995). Stimulation of phospholipase D by epidermal growth factor requires protein kinase C activation in Swiss 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* *270*, 3980-3988.
162. Zannetti,A., Luly,P., Musanti,R., and Baldini,P.M. (1997). Phosphatidylinositol- and phosphatidylcholine-dependent phospholipases C are involved in the mechanism of action of atrial natriuretic factor in cultured rat aortic smooth muscle cells. *J. Cell Physiol* *170*, 272-278.

163. Zeng,Y.Y., Benishin,C.G., and Pang,P.K. (1989). Guanine nucleotide binding proteins may modulate gating of calcium channels in vascular smooth muscle. II. Studies with guanosine 5'-(gamma)triphosphate. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *250*, 352-357.
164. Zhao,W., Chen,H., Xu,H., Moore,E., Meiri,N., Quon,M.J., and Alkon,D.L. (1999). Brain insulin receptors and spatial memory. Correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats. *J. Biol. Chem.* *274*, 34893-34902.
165. Zhao,W.Q., Chen,H., Quon,M.J., and Alkon,D.L. (2004). Insulin and the insulin receptor in experimental models of learning and memory. *Eur. J. Pharmacol.* *490*, 71-81.
166. Zhao,W.Q., De Felice,F.G., Fernandez,S., Chen,H., Lambert,M.P., Quon,M.J., Krafft,G.A., and Klein,W.L. (2008). Amyloid beta oligomers induce impairment of neuronal insulin receptors. *FASEB J.* *22*, 246-260.
167. Zhou,C. and Roberts,M.F. (1997). Diacylglycerol partitioning and mixing in detergent micelles: relevance to enzyme kinetics. *Biochim. Biophys. Acta* *1348*, 273-286.
168. 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*, 1012-1019.

Las publicaciones que se desprenden de la presente tesis son:

- **“Insulin action on polyunsaturated phosphatidic acid formation in rat brain: an “in vitro” model with synaptic endings from cerebral cortex and hippocampus”** Zulian SE, Ilincheta de Boschero MG, Giusto NM, 2009, 34. Neurochemical research. ISSN: 0364-3190
  
- **“Lipid metabolism in the central nervous system” Advances in Lipid Metabolism.** Salvador, G.A., Parquaré, S.J., Ilincheta, M.G., Zulian, S.E., Uranga, R.M., Mateos, M.V. and Giusto, N.M. Editor: María Sofía Giménez. Research Signpost., Cap. 7, 2008. ISBN: 978-81-308-0246-6.
  
- **“Insulin promotes diacylglycerol kinase activation by different mechanisms in rat cerebral cortex synaptosomes”** Zulian SE, Ilincheta de Boschero MG, Giusto NM. Journal of neuroscience research. 2006, 84(5), 1012-9. ISSN: 0360-4012.

- **“Insulin action in phosphatidic acid (PA) formation in synaptic terminals from adult and aged rats”**. Zulian, S.E.; Ilincheta de Boschero, M.G; Giusto, N.M. XLIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), Villa Carlos Paz, Córdoba, 8-11 de noviembre de 2008. Biocell Vol. 32, (Supl. 2008), ST-P14, pág.140.
  
- **“Activación de la diacilglicerol quinasa mediada por insulina, en sinaptosomas de corteza cerebral e hipocampo de ratas adultas y seniles”**. Zulian, S.E.; Ilincheta de Boschero, M.G; Giusto, N.M. LII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), Mar del Plata, 21-24 de noviembre de 2007. Medicina Vol. 67, (Supl. III-2007), 0520; pág. 211.
  
- **“Insulin-stimulated phosphatidic acid (PA) formation in rat CC synaptosomes. Is DAGK $\epsilon$  activated?”** Zulian, S.E.; Ilincheta de Boschero, M; Giusto, N.M. XLIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), Mar del Plata, 17-20 de noviembre de 2007. Biocell Vol. 31, (Supl. 2007), ST-P14, pág.100
  
- **“Insulin regulates a diacylglycerol kinase that preferentially utilizes 18:0-20:4 DAG in rat brain”**. Zulian, S.E.; Ilincheta de Boschero, M; Giusto, N.M. XLII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), Rosario, Santa Fé, 12-15 de noviembre de 2006. ST-P25; pág. 151.

- **“Insulin promotes diacylglycerol kinase (DAGK) activation by different mechanisms in rat cerebral cortex (CC) synaptosomes”**. Zulian, S.E, Ilincheta de Boschero, M. Y Giusto, N.M. XLI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), Pinamar, Buenos Aires, 3-6 de diciembre de 2005. Biocell Vol. 29, (Supl. 2005), ST-P35, pág.205.
  
- **“Acción de Insulina sobre la diacilglicerol quinasa (DAGK) de sinaptosomas de corteza cerebral (CC) de rata”**. Zulian, S., Ilincheta de Boschero, M. Y Giusto, N.M. III Jornadas de Bioquímica y Biología Molecular de Lípidos y Lipoproteínas. Bahía Blanca, Buenos Aires, 17-19 de agosto de 2005.
  
- **“Acción de Insulina sobre la actividad diacilglicerol quinasa (DAGK) de sinaptosomas de corteza cerebral (CC) de ratas adultas y seniles”**. Zulian, S., Ilincheta de Boschero, M. Y Giusto, N.M.VII Taller Argentino de Neurociencias. Villa Giardino, Córdoba, 7-11 de abril de 2005.
  
- **“Acción de insulina sobre la metabolización de diacilglicérido (DAG) exógeno en sinaptosomas de corteza cerebral (CC) de ratas adultas y seniles”**. Ilincheta de Boschero, M., Zulian, S., Giusto, N.M. Congreso Conjunto de Sociedades Biomédicas (SAIC, SAI, SAFE, SAB, SAN, SAF), Mar del Plata, 16 al 20 de noviembre de 2004. Medicina, vol. 64, supl. II, 2004, página 222, P514.
  
- **“Metabolización de diacilglicerol (DAG) exógeno en sinaptosomas de corteza cerebral (CC) de rata. Empleo de detergentes, calcio y**

**activadores de fosforilación**". Zulian, S., Ilincheta de Boschero, M., Giusto, N.M. Congreso Conjunto de Sociedades Biomédicas (SAIC, SAI, SAFE, SAB, SAN, SAF), Mar del Plata, 16 al 20 de noviembre de 2004. Medicina, vol. 64, supl. II, 2004, página 221, P513.

▪ **“Modulation of phosphatidic acid metabolism by insulin in cerebral cortex synaptosomes”**. G.A. Salvador, S.J. Pasquaré, M.G. Ilincheta de Boschero, S.E. Zulian, M. Mateos and N.M. Giusto. Thirty-Fifth Annual Meeting of the American Society for Neurochemistry, New York City, August 14-18, 2004.

▪ **“Actividad diacilglicerol quinasa (DAGK) en sinaptosomas de la corteza cerebral de rata. Su modificación en la edad avanzada”**. Ilincheta de Boschero M., Salvador, G, Pasquaré, S., Zulian, S. y Giusto, Norma. II Jornadas de Bioquímica y Biología Molecular de Lípidos y Lipoproteínas" INIBIOLP-Cátedra de Bioquímica. Facultad de Ciencias Médicas, UNLP, 13-15 de agosto de 2003.

**“Caracterización parcial de la actividad diacilglicerol quinasa de la fracción sinaptosomal de corteza cerebral de rata”**. Zulian, Sandra, Salvador, Gabriela, Ilincheta de Boschero, M. y Giusto, N.M XVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Neuroquímica (SAN), Los Cocos, Córdoba, 22-25 de octubre de 2003.