



Universidad de Valladolid

**FACULTAD DE MEDICINA
Dpto. de BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Y FISIOLÓGIA
INSTITUTO DE BIOLOGÍA Y GENÉTICA MOLECULAR (IBGM)**

TESIS DOCTORAL:

**LOCALIZACIÓN Y FUNCIÓN DE LA
LIPINA-1 EN MACRÓFAGOS**

Presentada por **Esperanza María Esquinas Tarifa** para optar al
grado de doctor por la **Universidad de Valladolid**

Dirigida por:

Dra. María Ángeles Balboa García

Dr. Jesús Balsinde Rodríguez

Esta tesis ha sido realizada gracias a la concesión de una beca del Programa “Junta para la Ampliación de Estudios Predoctoral” (Programa JAE Predoc) (BOE 16/08/2007) del Consejo Superior de investigaciones Científicas (CSIC).

Durante la realización de esta tesis he participado en diferentes proyectos que han dado lugar a las siguientes publicaciones:

Valdearcos M., **Esquinas E.**, Meana C., Peña L., Gil-de-Gómez L., Balsinde J., Balboa MA.(2012). *Lipin-2 reduces proinflammatory signaling induced by saturated fatty acids in macrophages*. J.Biol-Chem. Feb 8

Valdearcos M*, **Esquinas E.***, Meana C., Gil-de-Gómez L.,Guijas C., Balsinde J., Balboa MA.(2011). *Subcellular localization and role of lipin-1 in human macrophages*. J Immunol. 2011 May 15;186(10):6004-13.(*co-autores

Casas J., Meana C., **Esquinas E.**, Valdearcos M., Pindado J., Balsinde J., Balboa MA. (2009).*Requirement of JNK-mediated phosphorylation for translocation of group IVA phospholipase A2 to phagosomes in human macrophages*. J Immunol. Aug 15;183(4):2767-74.

ABREVIATURAS

μl	microlitros
μM	micromolar
aa	aminoácido
AA	ácido araquidónico
ADN	ácido desoxiribonucleico
ADNc	ADN complementario
AMPc	adenosín monofosfato cíclico
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
BEL	bromoenuol-lactona
BSA	albúmina de suero bovino
COX-2	ciclooxigenasa tipo 2
cPLA ₂ α	fosfolipasa A2 citosólica dependiente de Ca ²⁺
DAG	diacilglicerol
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
dNTPs	mezcla de deoxinucleótidos trifosfato
ELISA	ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
FBS	suero fetal bovino
GC-MS	cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
h	horas
HBSS	solución salina balanceada de Hank
HPLC-MS	cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas
iPLA ₂	fosfolipasa A ₂ independiente de Ca ²⁺
kDa	kilodalton
LPS	lipopolisacárido
MAPK	proteína quinasa activada por mitógenos
min	minutos
mM	milimolar
PA	ácido fosfatídico
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	tampón fosfato salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa

PGE ₂	prostaglandina E ₂
PKC	proteína quinasa C
PMA	forbol 12-miristato-13-acetato
qRT-PCR	PCR cuantitativa en tiempo real
SDS	dodecilsulfato de sodio
Ser	serina
RE	retículo endoplásmico
siRNA	ARN pequeño de interferencia
TAG	triacilglicerol/triglicéridos
TLC	cromatografía en capa líquida

ÍNDICE

I INTRODUCCIÓN.....	12
1. La familia de las lipinas.....	13
1.1 Funciones moleculares de la familia lipina.....	16
1.1.1 Actividad ácido fosfatídico fosfohidrolasa	16
1.1.2 Coactivador transcripcional	17
1.2 Funciones metabólicas de la lipina-1	19
1.2.1 Lipina-1 y lipodistrofia: ratones <i>fld</i>	19
1.2.2 Lipina-1 y Obesidad	22
1.3 Regulación de las lipinas.....	23
1.3.1 Regulación transcripcional	23
1.3.2 Regulación por procesamiento alternativo	25
1.3.3 Regulación por fosforilación	25
1.3.4 Regulación por localización subcelular	26
1.4 Implicación de las lipinas en enfermedades humanas	28
1.5 Actividad PAP1 e inflamación	30
2. Gotas lipídicas	31
2.1 Proteínas asociadas a las gotas lipídicas	32
2.2 Biogénesis de las gotas lipídicas.....	34
2.3 Crecimiento de las gotas lipídicas	35
2.4 Interacción de las gotas lipídicas con otros orgánulos.....	35
2.5 Regulación de la biogénesis de las gotas lipídicas por fosfolipasas de tipo A ₂	36
2.6 Implicación de las gotas lipídicas en el metabolismo celular	39
2.7 Gotas lipídicas e inflamación.	40
II OBJETIVOS.....	42
III MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Materiales y reactivos	44
2. Tampones y soluciones.....	45
3. Métodos Experimentales.....	46
3.1 Animales.	46
3.2 Cultivos de líneas celulares.....	46
3.3 Obtención de Macrófagos Peritoneales de Ratón.	46

3.4 Obtención de Monocitos y Macrófagos humanos	47
3.5 PCR.....	48
3.6 Construcciones y mutagénesis dirigida	49
3.7 Transfecciones	51
3.7.1 Transfecciones de vectores.....	51
3.7.2 Silenciamiento génico por ARN pequeño de interferencia (siRNA).....	51
3.8 Obtención de homogenizados celulares para su análisis por inmunoblot (Western-Blot).	52
3.8.1 Valoración de la concentración de proteína.....	52
3.8.2 Inmunoblot de proteínas (Western blot)	52
3.8.3 Fraccionamiento subcelular	53
3.9 Microscopía Confocal	54
3.10 Cuantificación de las gotas lipídicas.	57
3.11 Ensayo de liberación de AA	57
3.12 Extracción de lípidos y separación de TAG en TLC	58
3.13 Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).....	58
3.14 Análisis de especies de fosfolípidos mediante cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS).....	60
3.15 Cuantificación de PGE ₂	60
3.16 Preparación de diferentes estímulos.....	60
3.17 Análisis Estadístico.....	61

IV RESULTADOS

1. Expresión de la familia lipina	63
1.1 Expresión de las lipinas en monocitos y macrófagos.....	63
1.2 Expresión de la familia lipina en la diferenciación de monocito a macrófago	63
2. Localización subcelular de la lipina-1 en macrófagos humanos.....	67
2.1. Lipina 1 α	68
2.1.1 La Localización de la lipina-1 α no cambia en macrófagos activados.	73
2.1.2 Orientación de la lipina-1 α en gotas lipídicas.....	75
2.2 Lipina 1 β	76
2.3 Efectos de la coexpresión de lipina-1 α y lipina-1 β en macrófagos.....	79
2.4 Localización subcelular de la lipina-1 endógena en macrófagos humanos....	80

3. Función de la lipina-1 en la síntesis lipídica	82
3.1 Papel de la lipina-1 en la síntesis de TAG en macrófagos humanos	82
3.2 Función de la lipina-1 en la formación de gotas lipídicas	85
3.3 Perfil lipidómico de las gotas lipídicas en macrófagos deficientes en lipina-1	89
4. La lipina-1 controla el nivel de activación de la cPLA₂α.....	91
4.1 La lipina-1 controla el nivel de la fosforilación de la cPLA ₂ α.....	92
4.2 La lipina-1 controla los niveles de eicosanoides producidos por los macrófagos.....	93
4.3 Otros mecanismos que intervienen en la regulación de la actividad cPLA ₂ α por lipina-1.....	94
5. Papel de la cPLA₂α y la lipina-1 en la biología de las gotas lipídicas	96
6. Localización subcelular de la lipina-2 y lipina-3	99
6.1 Lipina-2	99
6.2 Lipina-3	102

V DISCUSION

1. Expresión de las lipinas en la diferenciación macrofágica	106
2. Localización de la lipina-1 en macrófagos humanos	108
3. Papel de la lipina-1 en la síntesis de triglicéridos.....	110
5. La lipina-1 modula la regulación de la cPLA₂α	112
6. Función de la cPLA₂α y lipina-1 en biogénesis de las gotas lipídicas	113
7. Localización de las lipinas-2 y -3 en macrófagos humanos.....	114

VI CONCLUSIONES.....116

VII BIBLIOGRAFÍA.....119

INTRODUCCIÓN

Durante los procesos inflamatorios células del sistema inmune innato, como los macrófagos, constituyen la primera línea de defensa frente a microorganismos invasores, generando además señales para el reclutamiento de células más especializadas del sistema inmune que refuercen la respuesta.

Los macrófagos reciben una serie de señales procedentes de diversas moléculas presentes en los patógenos, que son reconocidas por receptores específicos en la superficie del macrófago. Estas señales son transmitidas al interior celular desde donde se coordinará la forma en que el macrófago a de actuar, suprimiendo y activando la transcripción de múltiples genes. Dentro de las moléculas señalizadoras que se producen en el interior de los macrófagos tras el reconocimiento de patógenos, existen moléculas de naturaleza lipídica con una gran capacidad de modular la actividad de diversas enzimas intracelulares, y por ello, de intervenir en las respuestas macrofágicas. Entre estas moléculas se encuentran el diacilglicerol y el ácido fosfatídico. Estos lípidos pueden producirse a través de diferentes rutas del metabolismo lipídico, pero existen actividades enzimáticas capaces de modular los niveles de ambos lípidos al mismo tiempo. Una de ellas es la diacilglicerol quinasa, y la otra es la ácido fosfatídico fosfohidrolasa o fosfatasa (PAP1). Mientras que la primera ha sido ampliamente estudiada en el sistema inmune, la segunda apenas ha sido motivo de estudio en este contexto debido, al menos en parte, a que su identidad génica fue desvelada gracias a la experimentación realizada en animales con grandes alteraciones metabólicas, donde las alteraciones inmunes pasaron desapercibidas.

Las proteínas que portan actividad específica PAP1 se conocen actualmente como lipinas y a pesar de que existen evidencias bioquímicas que apuntan a que estas enzimas deben tener un importante papel en la activación de los macrófagos, en la literatura apenas se encuentran referencias que se preocupen de ello.

La presente memoria de Tesis Doctoral intenta dar luz sobre la función de la lipina en la biología de los macrófagos, centrándose fundamentalmente en dos aspectos, por un lado su localización subcelular, y por otro, su papel en la formación de estructuras que acumulan lípidos neutros, a través de la regulación de enzimas que controlan la biogénesis de éstos.

1. La familia de las lipinas

Los triglicéridos (TAG) constituyen el principal almacén de energía en los animales. Se sintetizan a través de la acilación secuencial del glicerol-3-fosfato en la ruta descrita por Kennedy(1, 2), hace 60 años. El penúltimo paso de dicha ruta es la defosforilación del ácido fosfatídico (PA) para formar diacilglicerol (DAG), en una reacción llevada a cabo por la PAP (*phosphatidic acid phosphatase*) (**Fig. 1**). En mamíferos, las enzimas que contienen actividad PAP están codificadas por una familia de genes cuya secuencia fue descrita a principios de los 2000 y que reciben el nombre de lipinas (3).

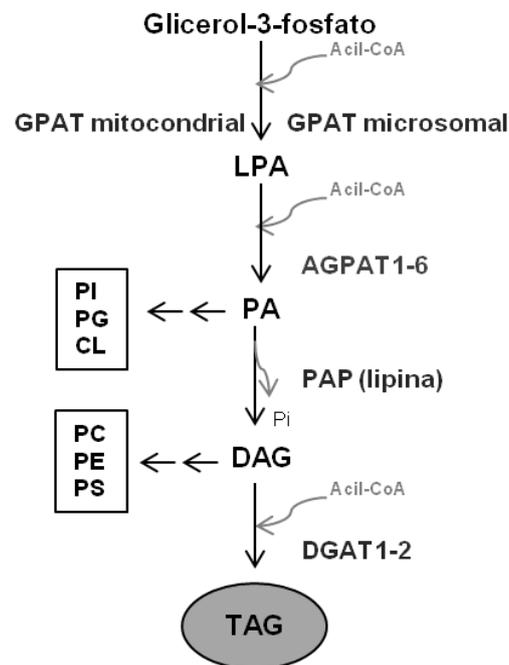


Figura 1. Síntesis de *novo* de TAG y glicerofosfolípidos por la ruta del glicerol fosfato. El punto de partida de la síntesis de *novo* de TAG y glicerofosfolípidos es el glicerol-3-fosfato que proviene del metabolismo de la glucosa. El primer paso consiste en la acilación del G-3-P por las enzimas glicerol-fosfato-aciltransferasa (GPAT) que residen en el retículo endoplásmico (RE) y mitocondria. A continuación se transfiere un nuevo ácido graso al ácido lisofosfatídico (LPA) por acción de las acilglicerol-fosfato-acil transferasa (AGPAT) para producir PA. El PA puede ser utilizado para la síntesis de fosfolípidos, como fosfatidilinositol (PI), fosfatidilglicerol (PG) y cardiolipinas (CL), o ser defosforilado por las lipinas. Finalmente el DAG se convierte en TAG a través de la acción de las diacilglicerol-acil transferasas (DGAT). Además el DAG es también precursor de la síntesis de fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilserina (PS).

La familia lipina fue identificada gracias a la aparición, a finales de los 80, de una mutación espontánea en la cepa de ratones BALB/cByJ, que produjo un fenotipo muy llamativo caracterizado por la aparición de hígado graso durante el período de lactancia y

múltiples defectos en el desarrollo del tejido adiposo y en el contenido de TAG(4, 5). Debido al hígado graso característico de estos ratones se les denominó *fld* de las siglas en inglés “*fatty liver dystrophy*”. En 2001, mediante técnicas de clonación posicional se identificó el gen *Lpin1* como responsable del fenotipo *fld*, y por similitud génica se encontraron dos genes adicionales en mamíferos, *Lpin2* y *Lpin3*(3). Estos genes codifican para las proteínas lipina-1, lipina-2 y lipina-3, respectivamente.

En ratones, el procesamiento alternativo del gen *Lpin1* da lugar a dos proteínas conocidas como lipina-1 α y lipina-1 β , que tienen 891 y 924 aminoácidos (aa) respectivamente(6). En humanos, el gen *LPIN1*, además de generar la lipina-1 α y lipina-1 β de 890 y 923 aa respectivamente(6), existe un procesamiento alternativo que da lugar a otra isoforma de 916 aa denominada lipina-1 γ (7). En levaduras, invertebrados y plantas la familia lipina la compone un único miembro (8).

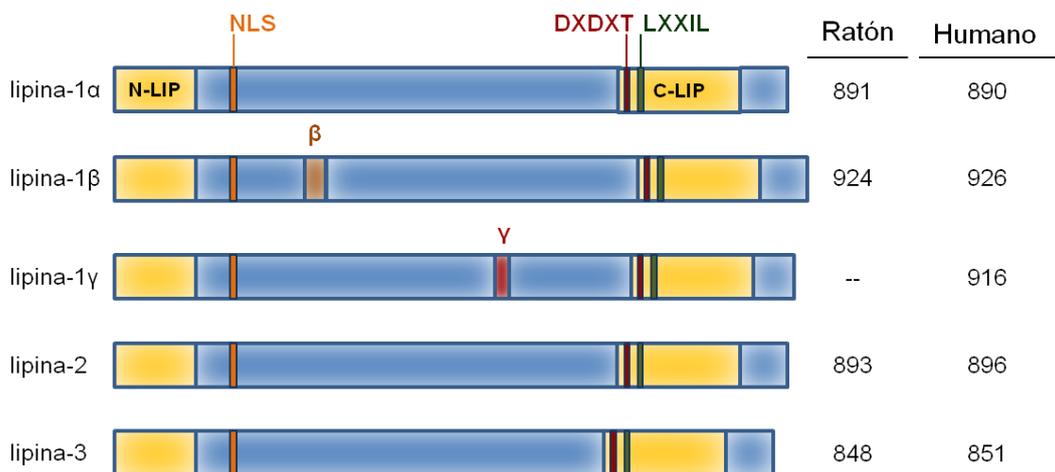


Figura 2. Motivos estructurales y funcionales de las proteínas de la familia lipina. En este diagrama se muestran las proteínas que forman la familia de las lipinas, y los dominios estructurales evolutivamente conservados. En el extremo amino terminal se encuentra el dominio N-LPIN y la señal de localización nuclear (NLS), mientras que el extremo carboxi terminal, se localiza el dominio C-LIP que contiene el motivo catalítico (DXDXT) y el motivo de actividad transcripcional (LXXIL). También se puede observar la inserción de las secuencias específicas de la lipina-1 β y lipina-1 γ . Figura modificada de()

En la secuencia de las lipinas existen dos regiones altamente conservadas, una en el extremo amino-terminal, el dominio N-LIP (*N-terminal lipin*), y otra en el extremo carboxi-terminal, el dominio C-LIP (*C-terminal-lipin*) (**Fig. 2**). Cerca del dominio N-LIP, se localiza un motivo polibásico, KKKKRRKK, que corresponde a una secuencia de localización nuclear (NLS) (9). En el dominio C-LIP se encuentran dos motivos funcionales

bien definidos, el motivo *DXDXT* y el motivo *LXXIL*. El primero está presente en todas las especies y es el responsable de la actividad catalítica PAP. El segundo está descrito en toda la familia lipina de mamíferos y es necesario para realizar la función de coactivador transcripcional, aunque *in vivo* esta función sólo se ha demostrado para la lipina-1(10).

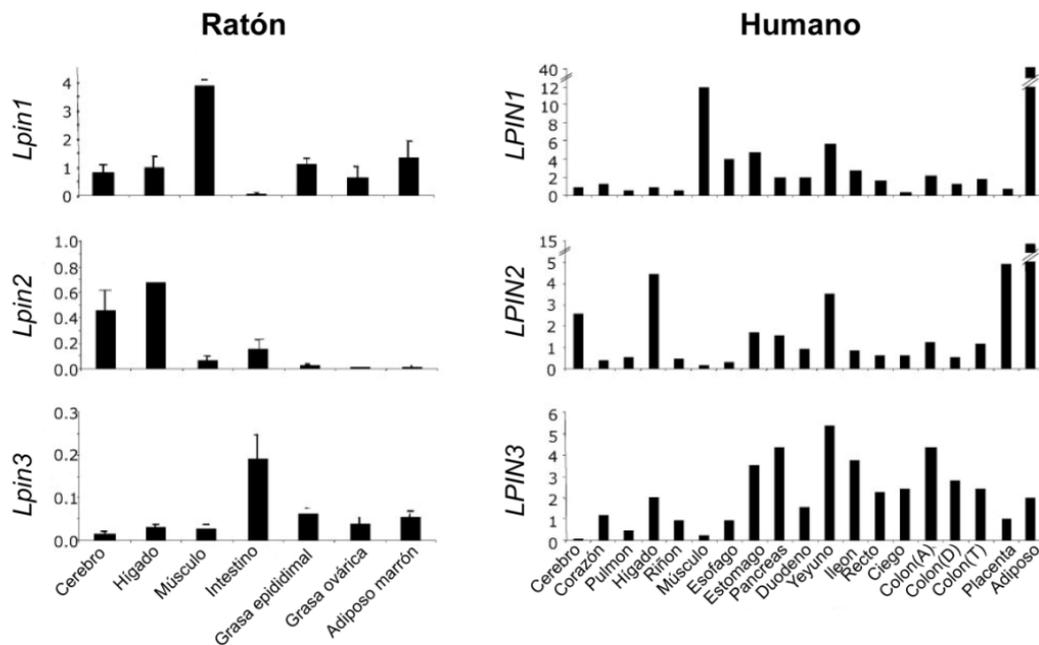


Figura 3. Expresión génica de la lipinas en ratón y humano. Figura adaptada de(11).

Los tres miembros de la familia lipina, poseen diferentes patrones de expresión tisular (**Fig. 3**), lo que sugiere que cada una de ellas podría desempeñar funciones específicas en cada tejido(11). En ratón la expresión de *Lpin1* es mayoritaria en músculo, *Lpin2* se expresa fundamentalmente en hígado y cerebro, y *Lpin3* en intestino. En humanos, encontramos niveles altos de ARNm de *LPIN1* en tejido adiposo, músculo esquelético, músculo cardiaco, testículos y en los nervios periféricos, y bajos niveles en hígado, riñón y cerebro. *LPIN2* se expresa principalmente en hígado y también en riñón, pulmón, cerebro, tracto gastrointestinal, glándulas salivares, tejidos linfoides y glóbulos rojos, mientras que *LPIN3* presenta niveles bajos de expresión en la mayoría de los tejidos, detectándose principalmente en el tracto gastrointestinal.

1.1 Funciones moleculares de la familia lipina

1.1.1 Actividad ácido fosfatídico fosfohidrolasa

Como se ha comentado anteriormente, las enzimas PAP son las responsables de producir el DAG que se utiliza para la síntesis de TAG y fosfolípidos (PC, PE y PS) en la ruta del glicerol fosfato. Las propiedades bioquímicas de estas enzimas han sido estudiadas durante años y existen dos tipos bien definidos (revisado en (12)). La actividad PAP1, es dependiente de magnesio (Mg^{2+}) y sensible a la presencia de agentes bloqueantes de los grupos tiol de las cisteínas (N-etil-maleimida, NEM), se localiza en el citosol y se transloca al retículo endoplásmico (RE) en respuesta a niveles altos de ácidos grasos libres(13). Por otro lado, existe la actividad PAP2, que es independiente de Mg^{2+} y no es sensible a NEM y reciben el nombre de fosfatasas LPP (*lipid phosphate phosphatase*), se localiza en la membrana plasmática e interviene en la síntesis de TAG por la ruta del monoacilglicerol fosfato que predomina en el intestino (14, 15). La actividad PAP1 tiene especificidad para el PA, mientras que las LPPs pueden hidrolizar los grupos fosfatos de otros lípidos, como el ácido lisofosfatídico, la ceramida-1-fosfato o la esfingosina-1-fosfato (11).

Las proteínas responsables de la actividad PAP1 fueron identificadas inicialmente gracias a los estudios realizados en *Saccharomyces cerevisiae*, que permitieron purificar e identificar la proteína Pah1p como responsable de esta actividad en levaduras. Posteriormente, análisis de similitud de secuencia en mamíferos identificaron las lipinas como las proteínas homologas a la Pahp1 de levaduras (8).

El motivo DXDXT donde reside la actividad catalítica, incluye a las lipinas dentro de la superfamilia de las haloácido halogenasas (HAD)(12, 16). El primer y el segundo residuo de aspártico son requeridos para la actividad PAP1 de la lipina. De hecho, la sustitución del primer aspártico por un glutámico elimina completamente la actividad catalítica(10). Para la actividad PAP1 también es importante un residuo de serina (Ser⁷³⁴) que se encuentra altamente conservado en el dominio C-LIP(17).

El análisis de la actividad PAP1 en tejidos de los ratones *fld* indica que la lipina-1 es la máxima responsable de dicha actividad en tejido adiposo, músculo esquelético, corazón y células del sistema nervioso periférico y, en menor medida, en hígado, cerebro y riñón(11, 18, 19). El hígado de los ratones *fld* presenta niveles normales de actividad PAP1, por lo que se piensa que otros miembros de la familia lipina podrían ejercer efectos

compensatorios. Se ha observado que aunque los niveles de ARNm de lipina-2 en el hígado de ratones *fld* son normales, los niveles de lipina-3 están aumentados considerablemente(11).Sin embargo, estudios de silenciamiento génico de lipina-2 en hepatocitos de ratones control y *fld*, mostraron que la actividad PAP1 disminuye drásticamente en ambos casos, fundamentalmente en los ratones *fld* (20).Por otro lado, en células HeLa, el tratamiento con siRNA frente a lipina-2 produce un incremento de la actividad PAP1, debido a que se produce un aumento en la expresión de la lipina-1 (21).Estos datos sugieren que la contribución de cada una de las lipinas a la actividad PAP1 total es dependiente del tipo celular.

A pesar que todas las lipinas tienen actividad PAP1, ésta es muy diferente en cada una de ellas (V_{max} lipina-1>lipina-2> lipina-3) (11)(Fig. 4A). Por otro lado, cuando se compara la actividad de las tres isoformas de la lipina-1 en humanos, la lipina-1 α y lipina-1 β presentan un perfil similar, mientras que la lipina-1 γ posee una actividad considerablemente menor(7)(Fig. 4B).

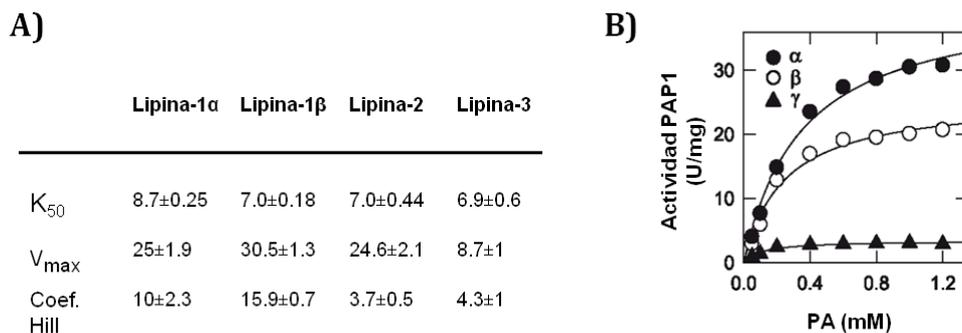


Figura 4. Actividad enzimática de las lipinas en mamíferos. A) La tabla muestra los valores de las constantes cinéticas de las diferentes lipinas. B) Actividad PAP1 de las isoformas de la lipina-1 en humanos. Figura adaptada de la referencia(11)y(7)

1.1.2 Coactivador transcripcional

Aunque las proteínas lipinas no contienen dominios de unión al ADN, el motivo LXXIL presente en el extremo C-terminal, le permite interactuar con receptores nucleares y activarlos (22, 23, 24). Debido a su capacidad cotranscripcional las lipinas podrían estar relacionadas con la diferenciación y biología de diferentes estirpes celulares.

En hepatocitos se ha demostrado que la lipina-1 forma un complejo con PPAR α y PGC-1 α que induce la expresión de genes implicados en el metabolismo oxidativo y reprime la expresión de diferentes genes involucrados en lipogénesis (10). Además, interacciona con PPAR δ , con el factor nuclear de hepatocitos 4 α (HNF-4 α), con el receptor de glucocorticoides, con factores adipogénicos como PPAR γ y C/EBP α y con la proteína de unión al elemento regulador de colesterol (SREBP-1) (10, 25, 26).

En diferenciación adipocítica, la lipina-1 α y la lipina-1 β ejercen papeles complementarios, induciendo la primera la expresión de factores de adipogénesis, la segunda la de genes implicados en síntesis lipídica, como la ácido graso sintasa o DAGT (6). La lipina-1 no sólo interacciona con factores involucrados en la homeostasis lipídica, también es capaz de reprimir la actividad transcripcional de NFATc4 e inhibir la secreción de citoquinas en adipocitos.(27).

En neuronas, la lipina-1 α se asocia con el factor MEF2, involucrado en la supervivencia y diferenciación de dichas células(28).

Las lipinas -2 y -3 también poseen el motivo LXXIL, aunque se conoce poco sobre su actividad cotranscripcional. Experimentos *in vitro* muestran que la lipina-2 tiene actividad cotranscripcional con PPAR γ similar a la que presenta la lipina-1(17), mientras que la lipina-3 interacciona físicamente con PPAR α (10). *In vivo* se desconoce la relevancia de estas actividades

La mutación en el motivo LXXIL no sólo suprime la función coactivadora de las lipinas sino que también elimina la actividad PAP1. Por el contrario, la mutación en el motivo catalítico no afecta a la actividad cotranscripcional de las lipinas (8, 10, 11).

No es común encontrar entre las enzimas del metabolismo lipídico proteínas que puedan a la vez tener actividad enzimática y actuar de coactivadoras transcripcionales como ocurre en el caso de las lipinas (**Fig. 5**). Sin embargo, algunas enzimas del metabolismo de los glúcidos si presentan esta doble función, como la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa(29) y la N-acetil-glucosamina transferasa(30).

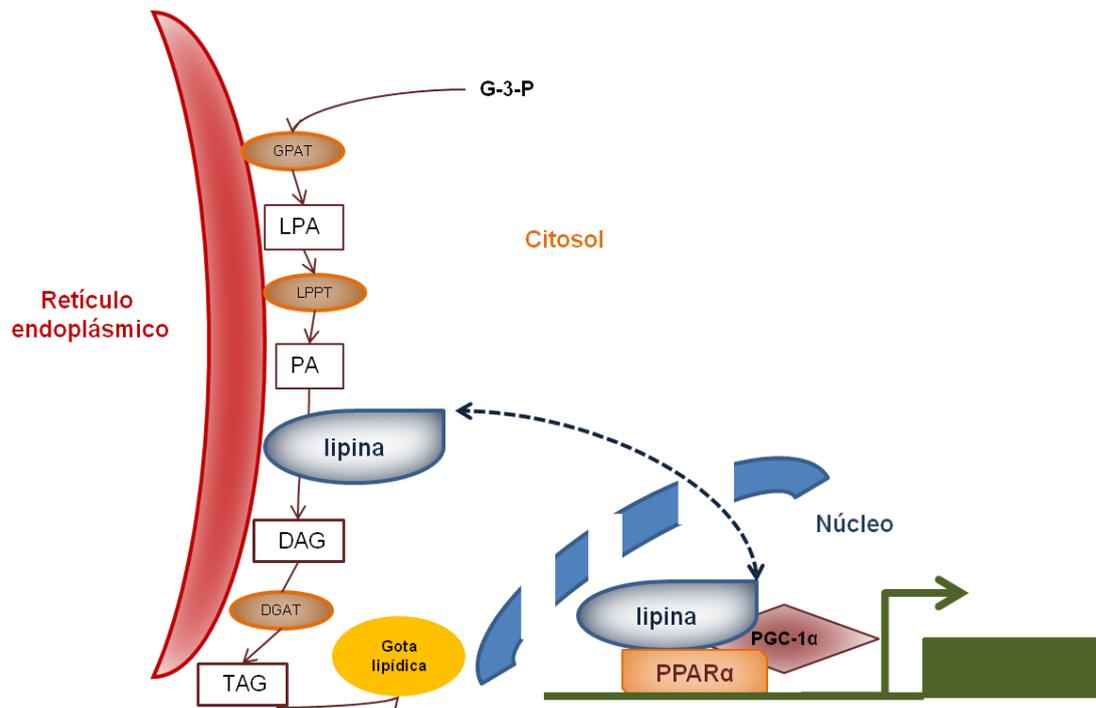


Figura 5. Dualidad funcional de las proteínas lipinas. Todas las enzimas requeridas para la síntesis de TAG residen en el RE, a excepción de la lipina, cuya localización es citosólica, pero se transloca a RE para llevar a cabo la actividad PAP1. Por otro lado, las lipinas pueden dirigirse al núcleo para interactuar con diversos factores de transcripción como el PGC-1 α y el receptor nuclear PPAR α , y así regular la expresión génica de genes implicados fundamentalmente en el metabolismo lipídico. Figura adaptada de <http://lipidlibrary.aocs.org/animbio/lipins/index.htm>

1.2 Funciones metabólicas de la lipina-1

El estudio de los ratones *fld* y ratones transgénicos que sobreexpresan la lipina-1 han ayudado enormemente a entender el papel que desempeña la lipina-1 en diferentes tejidos(3, 31).

1.2.1 Lipina-1 y lipodistrofia: ratones *fld*

Actualmente se conocen dos cepas de ratones con diferentes mutaciones en el gen de la lipina-1 que presentan idéntico fenotipo, los ratones *fld* y los *fld^{2j}* (3, 4, 5). Mientras que los ratones *fld* presentan una delección, una duplicación y una inversión de gran parte del gen *Lpin1*, los ratones *fld^{2j}*, sólo presentan una mutación puntual, que supone la sustitución de la glicina en posición 84 por una arginina (**Fig. 6**). La Gly84 se encuentra conservada en las secuencias homólogas de diversos organismos tales como: *Drosophila*

melanogaster, *Caenorhabdiis elegans*, *Arabidopsis thaliana*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Plasmodium falciparum*, y también en humanos. Este dato sugiere que la Gly84 es necesaria y esencial para la función de la lipina-1, puesto que la mutación en este aminoácido causa el fenotipo *fld*.

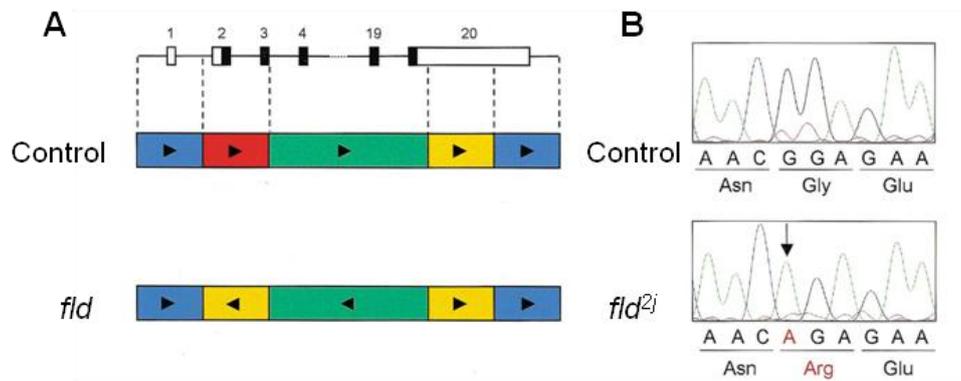


Figura 6. Estructura de los alelos mutantes *fld* o *fld*^{2j}. A) Estructura de los alelos del gen *Lpin1* en ratones control y *fld*. En la parte superior se muestran los exones numerados y representados en blanco, si son codificantes, y en negro, los no codificantes. El gen se divide en cinco segmentos de colores, de forma que en el alelo de los ratones *fld* hay una deleción del segmento rojo que contiene los exones 2 y 3, y una inversión del segmento verde, que es la que contiene la mayor parte de exones codificantes. Además, el segmento amarillo, ha sido duplicado e invertido. B) Sustitución de la glicina-84 por una arginina en el alelo *fld*^{2j}. Esta mutación ocurre en el dominio NLIP, que está muy conservado en numerosas especies. Figura modificada de (3)

Los ratones neonatos *fld* además de tener hígado graso se caracterizan por presentar hipertrigliceridemia, alteración del metabolismo lipídico y disminución de la actividad lipasa en el tejido adiposo. El hígado graso y la hipertrigliceridemia se resuelven tras el destete y cambio a dieta adulta. El ratón adulto *fld* se caracteriza por tener el tejido adiposo blanco y marrón atrofiados, y neuropatía progresiva, debido a un mal desarrollo de las vainas de mielina en las células de Schwann(19). Además, los ratones machos *fld* son estériles, efecto que tal vez esté relacionado con los altos niveles de expresión de la lipina-1 en testículos en ratones control(11).

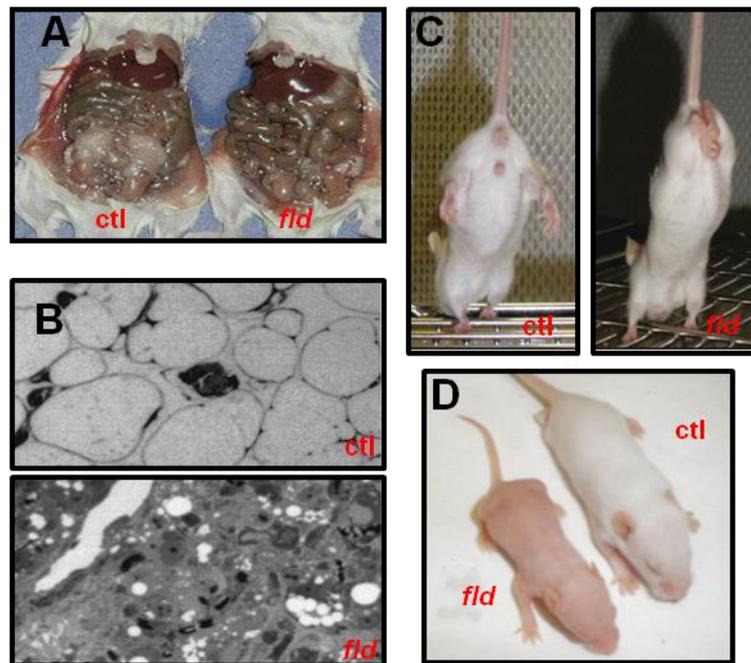


Figura 7. Fenotipo de los ratones *fld*. A) Vista ventral donde se observa una clara reducción del tejido adiposo epididimal en los ratones *fld*. B) Corte histológico del tejido adiposo epididimal. C) Comportamiento anómalo de las patas de los ratones *fld*, cuando son agarrados por la cola, como consecuencia de su neuropatía periférica. D) Ratones control (*ctl*) y *fld* de dos semanas de edad, donde la diferencia de tamaño y desarrollo es apreciable. Las imágenes A y B son adaptadas de la referencia(3), mientras que, las imágenes C y D, son fotos de la colonia de ratones *fld* de nuestro laboratorio.

La falta de la actividad PAP1 en los ratones *fld*, explica el fenotipo de estos animales por dos consecuencias diferentes. En primer lugar, la falta de lipina afecta directamente a la síntesis de TAG, por ello presentan lipodistrofía. Los ratones *fld* presentan una reducción del tejido adiposo del 80%, en comparación con los ratones control, dando lugar a una reducción del 25% en su peso(25). A nivel microscópico, el tejido adiposo de los ratones *fld* aparece poco diferenciado con células de aspecto fibroblástico y gotas lipídicas pequeñas (**Fig. 7**). En segundo lugar, la deficiencia en la actividad PAP1 da lugar a la acumulación de su sustrato, el PA mediador lipídico cuyo exceso puede interferir en la correcta señalización de procesos fisiológicos importantes (32). Relacionado con este último punto, se ha comprobado que la acumulación de PA reduce la mielinización y la expresión de marcadores de diferenciación en las células de Schwann, debido fundamentalmente a la activación de la ruta MEK-ERK (19).

La síntesis defectuosa de TAG en los ratones *fld* tiene otras consecuencias metabólicas, debido a que carecen de tejido adiposo y el almacenamiento de grasa en este tejido tiene un papel fundamental en los períodos de ayuno e inanición. Durante los

períodos de ingesta alimenticia, los animales sanos utilizan glucosa como fuente de energía, almacenando el exceso de ésta en forma de glucógeno en hígado y músculo, y en forma de TAG en el tejido adiposo. En períodos de ayuno utilizan, en primer lugar, las reservas de glucógeno de hígado y músculo, y a continuación, los TAG almacenados en el tejido adiposo, produciéndose energía por la β -oxidación de los ácidos grasos contenidos en ellos. Sin embargo, los ratones *fld* incrementan la síntesis de glucógeno durante la ingesta, almacenándolo en hígado y músculo, y utilizan los ácidos grasos generados en el hígado como fuente de energía, ya que no los pueden almacenar en el tejido adiposo. En períodos de ayuno, utilizan únicamente el glucógeno almacenado, debido a que la falta de depósitos lipídicos en el tejido adiposo, le impide hacer uso del programa normal de utilización de reservas energéticas durante el ayuno(33). Se piensa que el incremento en la oxidación de los ácidos grasos hepáticos puede ser la causa de la desaparición de hígado graso en los ratones adultos *fld*.

La falta de lipina-1 también produce alteraciones en el metabolismo de la glucosa ya que los ratones *fld* desarrollan intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina(34). De manera similar, se ha observado en adipocitos humanos una fuerte correlación positiva entre los niveles de expresión de la lipina-1 y del transportador de glucosa 4 (GLUT4)(35).

A pesar que los ratones *fld* no poseen un perfil lipídico plasmático con riesgo aterogénico, son más susceptibles a padecer aterosclerosis inducida por dieta (34). Aunque la causa es desconocida, se piensa que se debe al estado de resistencia a insulina y a una producción anómala de adipoquinas, siendo ambos factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares(36)

1.2.2 Lipina-1 y Obesidad

Diferentes estudios realizados en ratones transgénicos que sobreexpresan lipina en el tejido adiposo (*aP2-lipina-1 Tg*) o en músculo esquelético (*Mck-lipina-1 Tg*) resaltan el papel de esta proteína en el metabolismo celular(31).

Los ratones *aP2-lipina-1 Tg*, presentan un peso normal cuando son alimentados con una dieta estándar, pero cuando se alimentan con una dieta rica en grasa duplican el peso de los ratones control. Sin embargo, los ratones *Mck-lipina-1 Tg*, presentan una leve obesidad, que se hace más notoria cuando se alimentan con una dieta rica en grasa(31). El

gran aumento de peso de los ratones *Mck-lipina-1 Tg*, tanto con dieta equilibrada, como con dieta rica en grasa, se acompaña con una reducción del 15% del gasto energético, una disminución de la oxidación de ácidos grasos en músculo y un descenso de la temperatura corporal. Curiosamente los ratones *fld* exhiben un incremento en el gasto energético, elevada temperatura corporal y un aumento de la oxidación de ácidos grasos en músculo(4, 31).

En cuanto al metabolismo de la glucosa la sobreexpresión de lipina-1 provoca efectos diferentes dependiendo del tejido. Los ratones *aP2-lipina-1 Tg* aumentan su sensibilidad a la insulina y los *Mck-lipina-1 Tg* incrementan su resistencia a la insulina en comparación con ratones control (31). La resistencia a la insulina que presentan los ratones *Mck-1-lipin-1 Tg* puede deberse al grado de obesidad, aunque no se puede descartar que sea provocado por un efecto directo de la lipina-1 sobre el metabolismo lipídico en el músculo. Los ratones *aP2-lipina-1 Tg* presentan un aumento del 60% en el contenido de TAG en el tejido adiposo (6) debido a un aumento en la síntesis lipídica. Esta característica podría ser la responsable de la sensibilidad a insulina que exhiben, puesto que, una mayor captación e incorporación de ácidos grasos en TAG del tejido adiposo hace que otros tejidos metabólicamente activos, cómo músculo e hígado, queden menos expuestos a la acción dañina de los ácidos grasos circulantes.

1.3 Regulación de las lipinas

La lipina-1 se regula de una manera compleja, incluyendo: regulación transcripcional, procesamiento alternativo del ARNm, fosforilaciones y localización subcelular. Los diferentes niveles de regulación sugieren que la lipina se puede modular para adaptarse a las condiciones fisiológicas (37).

1.3.1 Regulación transcripcional

La lipina-1 se encuentra altamente regulada a nivel transcripcional. La expresión de la lipina-1 en hígado es inducida por ayuno(10), diabetes (10), alimentación rica en grasas(38), por AMPc (39), estatinas(40), glucocorticoides(10, 39, 41) y por exposición crónica a etanol(42)(Fig. 8). La mayoría de estos estímulos se conoce desde hace años que incrementan la actividad PAP1 en hígado(43, 44, 45, 46, 47, 48, 48).

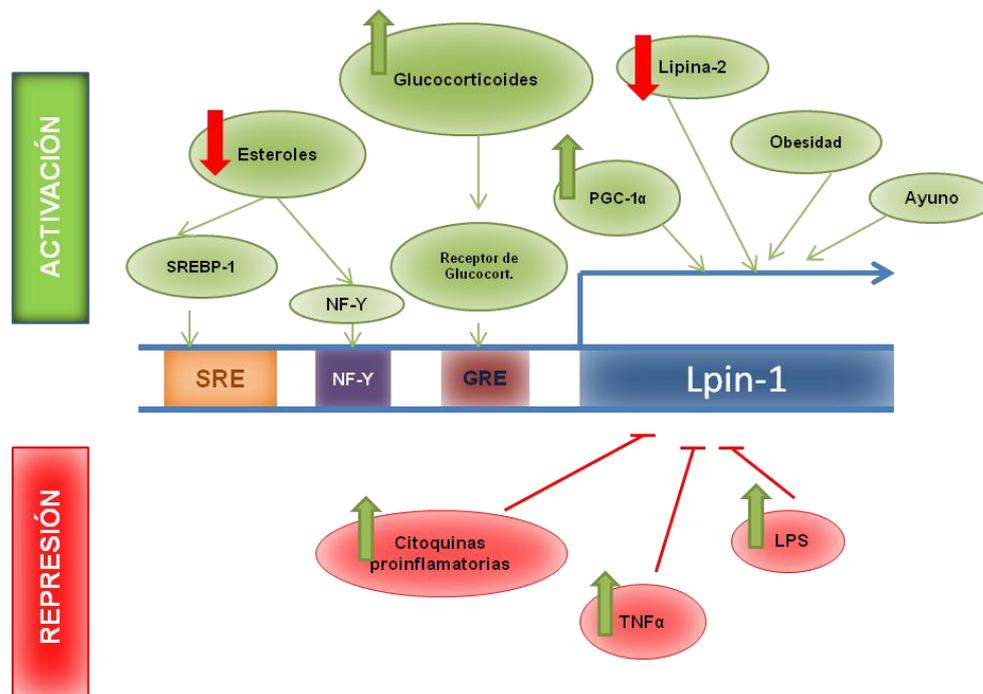


Figura 8. Regulación transcripcional del gen *Lpin1*. Diagrama de los elementos que regulan la expresión del gen *Lpin1*. En la parte superior se representan los factores que inducen la expresión de la lipina-1, mientras que las condiciones que disminuyen su expresión se muestran en la parte inferior. Figura adaptada de (37).

A nivel celular, la expresión de la lipina-1 aumenta con factores que estimulan la adipogénesis, como C/EBP, SREBP-1 o el receptor de glucocorticoides(40, 41, 49); con factores que incrementan el metabolismo oxidativo, como NOR-1, CREB, PGC-1 α , o CRTC2(10, 38, 50); y con la activación de los receptores β -adrenérgicos (50, 51).

La dexametasona incrementa la expresión del ARNm de la lipina-1 en hepatocitos, aumentando la expresión proteica y la actividad PAP1, sin afectar a la expresión de las lipinas 2 y 3(39). Los efectos de los glucocorticoides son potenciados por el AMPc o el glucagon, y disminuyen por la insulina. En diferenciación adipocítica, la lipina-1 aumenta su expresión por la acción de los glucocorticoides (41, 52). Además, situaciones relacionadas con altos niveles de glucocorticoides, como obesidad o ayuno, también producen un incremento de la expresión de la lipina-1 en tejido adiposo(41).

En células de hepatoblastoma humanas se ha descrito que la reducción de esteroides produce un aumento de la expresión de lipina-1. Esta inducción es regulada por los factores SREBP1 y NF-Y, los cuales se unen a motivos localizados en el promotor de la lipina-1(40).

Otros estímulos reprimen la expresión de la lipina-1, éste es el caso de los estrógenos en útero e hígado (53), o el zymosan o el lipopolisacárido(LPS) en adipocitos, en los que el efecto parece mediado por citoquinas proinflamatorias, como el TNF α e IL-1(54, 55).

Se conoce poco sobre la regulación de los otros miembros de la familia lipina, pero en cultivos celulares se ha observado que las lipinas-1 y -2 se pueden regular negativamente entre sí. En células HeLa, el silenciamiento génico de la lipina-1 o lipina-2 provoca un incremento en la expresión del ARNm de la otra proteína y en las células 3T3-L1, el silenciamiento de la lipina-1 provoca un aumento en los niveles de expresión de la lipina-2. Sin embargo, los efectos sobre la actividad PAP1 difieren. En células HeLa el silenciamiento de la lipina-1 produce una reducción drástica de la actividad PAP1, mientras el silenciamiento de la lipina-2 incrementa la actividad PAP1 (21). La interacción entre los diferentes miembros de la familia lipina *in vivo* es un aspecto que aún no ha sido estudiado.

1.3.2 Regulación por procesamiento alternativo

En ratón, la lipina-1 se expresa en dos isoformas, conocidas como lipina-1 α y lipina-1 β , teniendo esta última 33 aa adicionales que no están presentes en la lipina-1 α . El procesamiento alternativo del ARNm de la lipina-1 parece tener un patrón de regulación dependiente de cada tejido. Así por ejemplo, mientras que en cerebro, bazo y preadipocitos predomina la lipina-1 α , en hígado, corazón, riñón y adipocitos maduros la lipina-1 β es la mayoritaria(6). En preadipocitos, la lipina-1 α es la isoforma mayoritaria, sin embargo, durante la diferenciación adipocítica la expresión de la lipina-1 β aumenta de manera considerable, constituyendo la isoforma predominante en adipocitos maduros(6). Hasta el momento se conoce muy poco sobre la regulación de la lipina-1 por procesamiento alternativo y su importancia fisiológica.

1.3.3 Regulación por fosforilación

En la secuencia de la lipina-1 se han identificado un total de 23 residuos susceptibles de ser fosforilados en presencia de insulina(18). Entre ellos destacan tres residuos serina (Ser¹⁰⁶, Ser⁶³⁴ y Ser⁷²⁰), que se encuentran altamente conservados en las

lipinas de mamíferos y de levaduras (**Fig. 9**). Los estudios realizados indican que la Ser¹⁰⁶ es el principal residuo que se fosforila por insulina y es dependiente de la ruta mTOR, aunque se desconocen las quinasas responsables (56)(18). Además, estudios realizados en células HeLa demuestran que la lipina-1 y la lipina-2 se fosforilan en secuencias consenso para ciclina-1 (Cdk1) durante la mitosis(21). En contraste con la insulina, el ácido oleico y la epinefrina promueven la desfosforilación de la lipina-1(18), a través de la proteína Dullard (57). El estado de fosforilación provocado por la insulina o el ácido oleico no afectan a la actividad PAP1, pero si influye en su localización celular, sin embargo, la fosforilación producida por las Cdk1 provoca una disminución de la actividad PAP1.

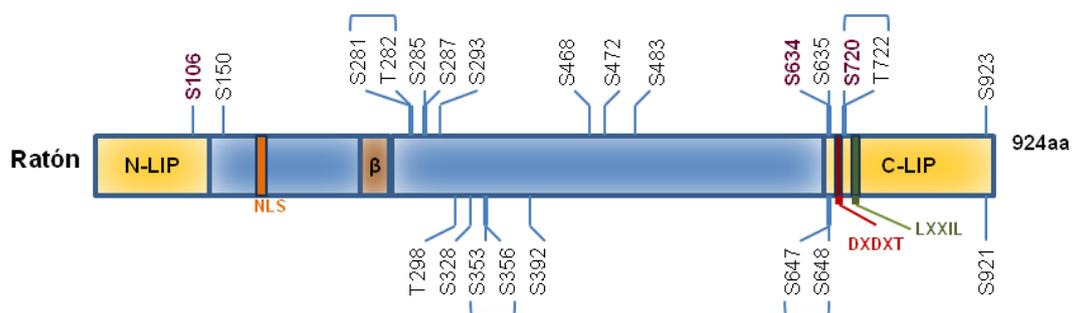


Figura 9. Sitios de fosforilación de la lipina-1 β . Se han identificado 19 sitios susceptibles a fosforilación mediante espectrometría de masas. Los residuos S281/T282, S353/S356, S647/S648 y S720/T222 indican pares de aa donde cualquiera de los dos puede ser fosforilados. Los residuos sombreados de color magenta están altamente conservados en todas las lipinas. Figura modificada de (18).

1.3.4 Regulación por localización subcelular

La localización de la lipina-1 puede ser modulada por varios factores (**Fig. 10**). En hepatocitos y adipocitos la compartimentación de la lipina-1 entre citosol y las membranas microsomales parece estar influenciada por el estado de fosforilación, sin afectar a la actividad PAP1. La lipina-1 se fosforila en presencia de insulina y en estas condiciones predomina una localización citosólica, sin embargo, el ácido oleico disminuye la fosforilación de la lipina-1 y promueve la asociación a membranas microsomales (18, 56). La estimulación con ácido oleico también produce una asociación de la lipina-2 a membranas microsomales en células HEK 293 que sobreexpresan esta proteína. (17). En hígado, al igual que ocurre para la lipina-1, la mayor parte de la lipina-2 fosforilada se localiza en citosol (20). Además se ha descrito que la interacción de la lipina-1 con las

proteínas 14-3-3 es determinante para su localización citoplasmática, y se promueve por el incremento de fosforilación que produce la insulina.(58)

Existen otras modificaciones que pueden influir en la localización intracelular de la lipina. Todas las lipinas contienen una secuencia de localización nuclear (NLS), que les permite acceder al núcleo e interactuar con diversos factores de transcripción. En un principio se creyó que aunque las dos isoformas de la lipina-1 tienen un motivo NLS, la lipina-1 α era exclusivamente nuclear y la lipina-1 β citoplasmática. Actualmente se conoce que tanto la lipina-1 α como la lipina- β se pueden localizar en núcleo, citoplasma o presentar ambas localizaciones.(6, 28, 58, 59). La supresión del NLS, provoca una exclusión de la lipina-1 α del núcleo en hepatocitos y en la línea adipocítica 3T3-L1, sin que ello afecte la actividad PAP1, aunque sí afecta a su capacidad para unirse a membranas microsomales (59). Esto indicaría que el sitio NLS podría tener una función importante para la asociación de la lipina-1 a membranas(9, 59).

En neuronas la localización de la lipina-1 α está regulada por sumoilación, existiendo dos sitios consenso de sumoilación en la secuencia de la lipina-1 α y lipina-1 β , que corresponden con dos lisinas que se localizan cerca del dominio C-LIP. La sumoilación de la lipina-1 α en neuronas permite su entrada en núcleo y la realización de sus funciones como coactivador transcripcional, ya que mutaciones en los sitios de sumoilación dificultan la localización nuclear y la interacción con los factores de transcripción PGC-1 α y MEF2 (28). No se conoce el significado biológico de estos sitios para la lipina-1 β . La secuencia de la lipina-2 también presenta un sitio de sumoilación localizado cerca del NLS, pero aún no se ha demostrado que esta modificación ocurra en esta proteína. La lipina-3 y la lipina de invertebrados y levaduras no contienen estos sitios.

Los niveles celulares de PA parecen influir en la localización nuclear de la lipina-1, ya que la reducción farmacológica de los niveles de PA provoca un aumento de la expresión de lipina-1 en núcleo(9).

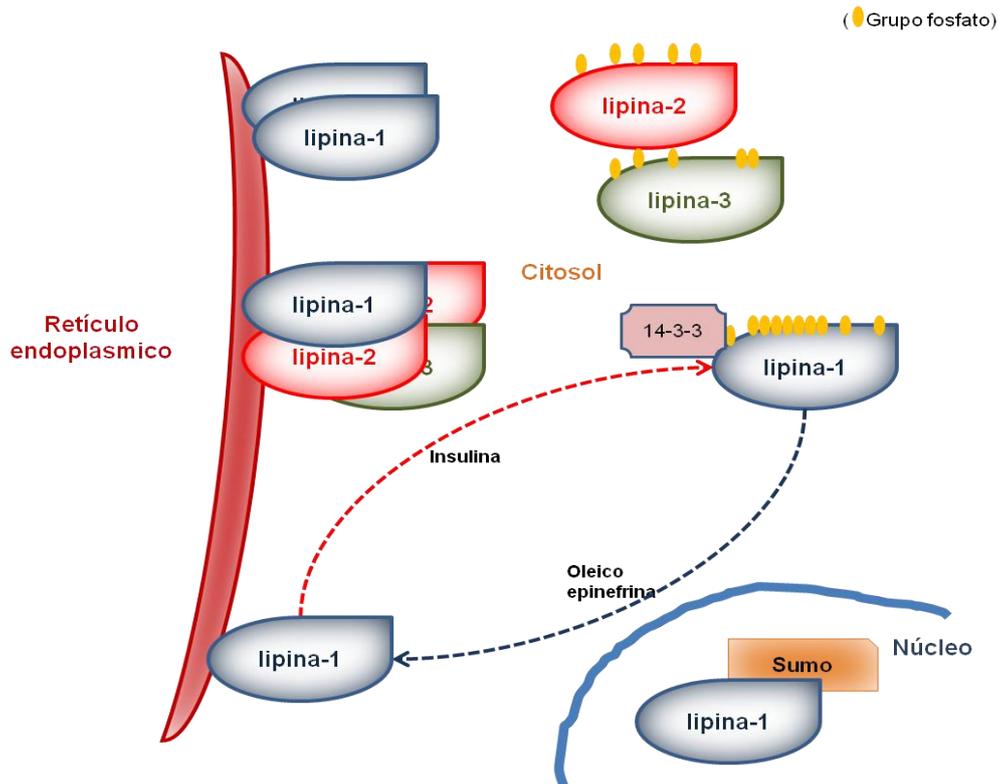


Figura 10. Regulación de la localización subcelular de la lipina-1. La localización subcelular de las lipinas depende del estado de fosforilación. La lipina-1 es fosforilada por insulina favoreciendo su localización citosólica. Esta señalización provoca la unión con las proteínas 14-3-3, siendo éste un factor determinante para la localización citosólica de la lipina. Sin embargo, ácidos grasos como el ácido oleico, o la epinefrina, promueven la desfosforilación de la lipina-1 y su translocación a RE, donde pueden formar homo o heterolímeros con otras lipinas. La localización nuclear de la lipina-1 parece estar regulada por sumoilación. Figura modificada de <http://lipidlibrary.aocs.org/animbio/lipins/index.htm>

Por último, se ha descrito que las proteínas lipinas de mamíferos pueden asociarse entre ellas por el extremo N-terminal o C-terminal formando homo o heterolímeros extremadamente estables (60). Aunque las implicaciones biológicas de la formación de estos complejos sobre la actividad PAP1 o la función coactivadora se desconocen, otras enzimas involucradas en la síntesis de TAG también forman tetrámeros, sugiriendo que estos agregados podrían conferir una ventaja en la eficiencia enzimática(61).

1.4 Implicación de las lipinas en enfermedades humanas

Estudios en los genes *LPIN1* y *LPIN2* han demostrado que las lipinas son responsables de varias enfermedades raras de herencia recesiva (**Fig. 11**).

La primera mutación descrita que causa deficiencias en la función de la lipina-1 en humanos, consiste en la sustitución del ácido glutámico en la posición 769 por una glicina (Glu769Gly)(62). Los individuos heterocigotos u homocigotos para esta mutación presentan episodios de mioglobinuria, debilidad, y dolor muscular antes de los siete años de edad, pudiendo deberse estos efectos a la acumulación de lisofosfolípidos y PA en el músculo. Existe otra mutación, que se debe al cambio de la prolina en posición 610 por una serina (Pro610Ser), que provoca miopatía recurrente tras el tratamiento con estatinas(62).

Sin embargo, las mutaciones descritas que causan lipodistrofia en humanos, no corresponde al gen *LPIN1*. Una salvedad en este sentido lo presentan los pacientes con VIH que desarrollan lipodistrofia, ya que tienen disminuida la expresión de la lipina-1 en comparación con pacientes sin lipodistrofia(63).

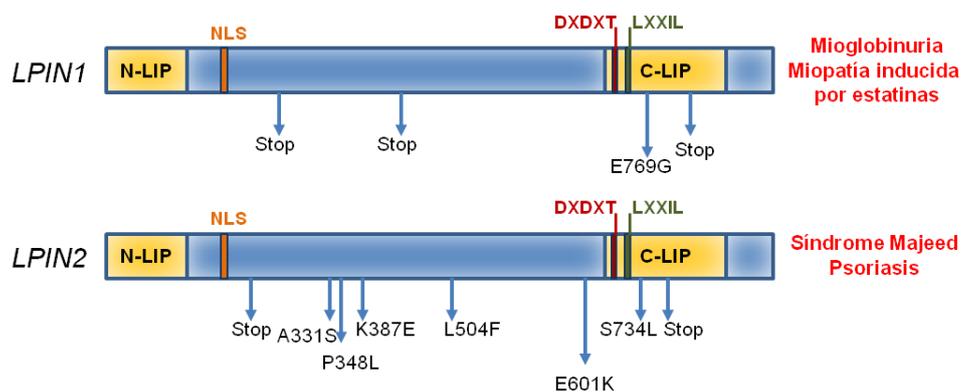


Figura 11. Diagrama de las mutaciones de las proteínas lipinas en humanos. La posición y el tipo de mutaciones se muestran a lo largo de cada proteína. Los fenotipos que van asociados a estas mutaciones se muestran a la derecha de cada proteína. El stop representa el cambio de un simple nucleótido que introduce un codón de stop, y por tanto genera una proteína truncada. Figura modificada de (23).

Se ha realizado un único experimento en pacientes obesos donde se ha monitorizado la expresión de la lipina-1 β antes y después de una operación de reducción de estómago. Los niveles del ARNm de la lipin-1 β en hígado y tejido adiposo aumentan en paralelo con la mejora en la sensibilidad a insulina y la pérdida de peso(64). Pacientes con síndrome de ovario poliquístico, presentan una disminución de la expresión de la lipina-1 β en el tejido adiposo visceral y subcutáneo, independientemente del índice de masa corporal.(65).

Además se han identificado varios polimorfismos del gen *LPIN1* asociados con factores relacionados con el síndrome metabólico, como son el índice de masa corporal, niveles de insulina, presión sanguínea y niveles de ácidos grasos; aunque estos haplotipos varían según la etnia estudiada(66)(67)(68). También se han descrito polimorfismos específicos del gen *LPIN1* asociados a la respuesta al tratamiento con tiazolidinedionas frente a la diabetes tipo 2 (69).

La mutación en el gen *LPIN2* causa una rara enfermedad recesiva conocida como Síndrome de Majeed. Esta enfermedad se caracteriza por osteomielitis multifocal crónica recurrente, inflamación cutánea, fiebre y anemia diseritropoyética (70, 71, 72). Estos síntomas puede deberse a la ausencia de la lipina-2 en glóbulos rojos y linfocitos, donde su expresión es mayoritaria con respecto al resto de miembros de la familia lipina(17). Se han identificado varias mutaciones asociadas al Síndrome de Majeed (**Fig. 11**). Una de ellas supone el cambio de la serina 734 por una leucina (S734L). Esta mutación anula la actividad PAP1 de la lipina-2 (y también de la lipina-1) pero no afecta su asociación a membranas microsomales o a su función de coactivador transcripcional (17). Por otro lado, varias mutaciones en el gen *LPIN2* están asociadas con psoriasis(73), y ciertos polimorfismos del gen *LPIN2* están asociados a diabetes de tipo 2(74).

Los efectos que provocan la falta de lipina-1 o lipina-2, establece que cada una de ellas desempeña funciones fisiológicas específicas que no puede ser sustituidas por otros miembros de la familia.

1.5 Actividad PAP1 e inflamación

La idea que las enzimas con actividad PAP1 regulen los procesos inflamatorios ha sido objeto de estudio durante muchos años, aunque la falta de herramientas genéticas o proteicas han dificultado los avances en este sentido. Los primeros estudios realizados mediante el uso de diferentes inhibidores no específicos de la PAP1, apuntaron a que esta actividad era relevante en la liberación/producción de lípidos proinflamatorios, como el ácido araquidónico (AA), o su metabolito oxigenado la prostaglandina E2 (75, 76), ya que posiblemente intervenía en la activación de la fosfolipasa GIVPLA₂(cPLA₂α), y en la inducción génica de la ciclooxigenasa de tipo 2 (COX-2). La primera enzima es la responsable de la liberación del AA de los fosfolípidos de membrana donde está esterificado, y la segunda, metaboliza dicho ácido para producir mediadores inflamatorios

conocidos como prostaglandinas. Estudios posteriores han descrito resultados similares en la línea promonocítica humana U937 (76, 77).

Por otro lado, diferentes estudios han demostrado que la actividad PAP1 es importante para el mantenimiento de la homeostasis de células inmunes. En células U937 la inhibición de la actividad PAP1 produce una profunda desregulación del metabolismo lipídico, disminuyendo la síntesis de los fosfolípidos y TAG, e incluso llegando a producir apoptosis por la ruta mitocondrial(78).

Todos estos estudios sugieren que las lipinas podrían tener un importante papel en las células del sistema inmune, interviniendo en diversos procesos, como la respuesta inflamatoria y el mantenimiento de la homeostasis lipídica.

2. Gotas lipídicas

El almacenaje de lípidos en las células de mamíferos ha sido considerado un proceso beneficioso en el cual el exceso de ácidos grasos se convierte en lípidos neutros que se depositan en inclusiones citoplasmáticas. Estas inclusiones citoplasmáticas han recibido multitud de nombres, entre ellos, cuerpos lipídicos, partículas lipídicas o cuerpos de aceite, aunque actualmente está generalizado el uso del término “gotas lipídicas” (24, 79).

En células de mamíferos las gotas lipídicas, están formadas por un núcleo de lípidos neutros, principalmente triglicéridos y ésteres de colesterol, rodeado de una monocapa de fosfolípidos donde se localizan diversas proteínas asociadas(80) (**Fig. 12A**)(79). Estos orgánulos se encuentran en la mayoría de las células eucariotas y su tamaño varía entre $1\mu\text{M}$ y $100\mu\text{M}$, dependiendo del tipo celular (**Fig. 12B**). En los adipocitos hay una única gota lipídica de gran tamaño y, quizás, es el más conocido y caracterizado. Este orgánulo ocupa todo el citosol, se localiza muy cerca de la membrana plasmática y se asocia a filamentos intermediarios, por lo que presenta una limitada movilidad en el interior de la célula. Por el contrario, las gotas lipídicas que se encuentran en el resto de células, son de menor tamaño ($1\text{-}10\mu\text{M}$), número variado, y se localizan cercanos al RE, mitocondrias y peroxisomas, presentando una mayor movilidad por interacción con microtúbulos(81).

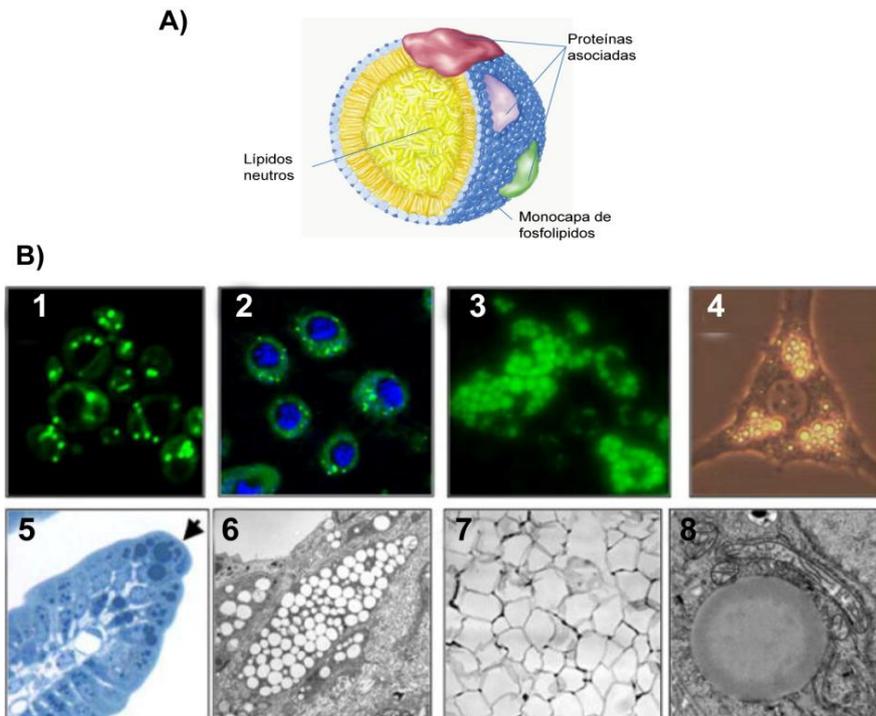


Figura 12. Gotas lipídicas .A) Estructura de una gota lipídica. B) Ejemplos de gotas lipídicas en células eucariotas: 1) gotas lipídicas de *Saccharomyces cerevisiae*, 2) de células S2 de *Drosophila*, y 3) de adipocitos murinos, todos ellos teñidos con BODIPY. 4) Gota lipídica en un adipocito derivado de células OP9, vistos al microscopio invertido con contraste de fases. 5) Gotas lipídicas de enterocitos intestinales teñidos con tetróxido de osmio. 6) Imagen de microscopía electrónica de macrófagos espumosos en una lesión aterogénica de ratón. 7) Sección de tejido adiposo donde se observa el gran volumen celular ocupado por una única gota lipídica de estas células. 8) Imagen de microscopía electrónica donde se observa la estructura de una gota lipídica en un hepatocito de ratón. Figura modificada de (82) y del libro *Lehninger Principios de Bioquímica*.

2.1 Proteínas asociadas a las gotas lipídicas

En la superficie de las gotas lipídicas se encuentran proteínas con diversas funciones estructurales y metabólicas que varían dependiendo del tipo celular. Las primeras proteínas que se describieron, son las pertenecientes a la familia PAT (Perilipina, ADRP y TIP47), las cuales presentan funciones importantes en el metabolismo de los lípidos almacenados. Entre el resto de las proteínas que se asocian a las gotas lipídicas, se encuentran enzimas involucradas en la síntesis de triglicéridos y fosfolípidos (AcilCoa sintetasa, DGAT2, fosfocolina citidiltransferasa), proteínas implicadas en la formación de vesículas y su transporte (ARF1, Rab5 y Rab18) y también proteínas que participan en procesos de reconocimiento y fusión de membranas, las proteínas conocidas como SNAREs (*Soluble NSF Attachment Receptor*) (83, 84, 85, 86, 87).

La familia de proteínas PAT recibe su nombre por los primeros miembros descubiertos: Perilipina, ADRP (*adipocyte differentiation related protein*, se conoce como adipofilina) y la proteína “Tail-interacting protein” de 47 kDa (TIP47) (88). Posteriormente se han descrito nuevos miembros de esta familia: la proteína S13-12 y la proteína LSDP5 (*lipid storage droplet protein 5*)(89). Las proteínas PAT presentan en su estructura un dominio altamente conservado, el cual parece ser el responsable de su unión a la superficie de las gotas lipídicas (90). En adipocitos, se ha descrito que la distribución de la familia PAT en la superficie de la gota lipídica depende del tamaño de éste, encontrándose adipofilina y perilipina en las gotas lipídicas de mayor tamaño, y TIP47 y S3-12, en los más pequeños (91). La perilipina y la adipofilina se localizan exclusivamente en gotas lipídicas, mientras el resto de miembros de la familia PAT se localizan en el citosol y tras la estimulación con ácidos grasos, se translocan a la membrana de este orgánulo(91).

La perilipina sólo se expresa en adipocitos y células esterogénicas (92) y parece tener un papel importante en la regulación de la lipólisis, protegiendo a las gotas lipídicas de la acción de las lipasas. Sin embargo, en presencia de ácidos grasos, la perilipina es fosforilada y permite el acceso de las lipasas a la superficie de las gotas lipídicas para hidrolizar los triglicéridos localizados en su interior(93).

La ADRP se encuentra en todos los tipos celulares (94) y su nivel de expresión depende de la cantidad de lípidos neutros existentes en la célula(95). Se ha demostrado que la ADRP es capaz de unir colesterol y ácidos grasos para promover la acumulación a TAG y estimular la incorporación de ácidos grasos(96).

En cuanto a TIP47, que se localiza en citosol y sólo se asocia a las gotas lipídicas por la presencia de ácidos grasos libres, también parece desempeñar una función de protección frente a la lipólisis(97), y además, parece estar involucrada en el transporte intracelular del receptor de manosa-6-fosfato desde los endosomas hacia la red trans del Golgi(98, 99) .

Por su parte, la proteína LSDP5 se localiza en el músculo cardiaco y esquelético, donde inhibe la lipólisis, favorece la β -oxidación de ácidos grasos y la acumulación de TAG(100).

2.2 Biogénesis de las gotas lipídicas

Actualmente se proponen tres modelos para explicar el origen de las gotas lipídicas. Todos ellos proponen que las gotas lipídicas se originan a partir de determinadas regiones del RE, dónde se localizan la mayor parte de las enzimas involucradas en la síntesis de TAG (82, 101).

El modelo de Gemación propone, que los lípidos neutros se acumulan dentro de la bicapa de la membrana del RE, produciéndose un engrosamiento del espacio intermembrana (**Fig. 13A**), y la gota lipídica se forma a partir de la gemación de la monocapa citosólica en un proceso dependiente de varios factores citosólicos (79, 82, 102).

El modelo Bicela también propone la formación de gotas lipídicas a partir de la acumulación de ácidos grasos en el espacio intermembrana y el subsiguiente engrosamiento (**Fig. 13B**). En este caso, la formación de la gota lipídica se produce cuando se escinden las dos hemicapas de la membrana del RE (103). Esta hipótesis presenta un importante dilema ya que la ruptura de la bicapa produciría una salida descontrolada de iones calcio y proteínas residentes del retículo, y la integridad de la bicapa lipídica del retículo quedaría muy afectada.

El modelo de Gemación Vesicular, expone que la gota lipídica se forma mediante un proceso similar a la gemación de vesículas celulares, sugiriéndose que esto ocurre en una zona especializada del RE diferente a la dedicada al transporte de vesículas y especializada en la síntesis de lípidos (**Fig. 13C**). En este escenario, la vesícula naciente permanece en contacto con el RE. El crecimiento de la gota lipídica provocaría el aumento del lumen del orgánulo, haciendo desaparecer completamente la hemicapa interna de la gota, formando así la monocapa característica de las gotas lipídicas(104).

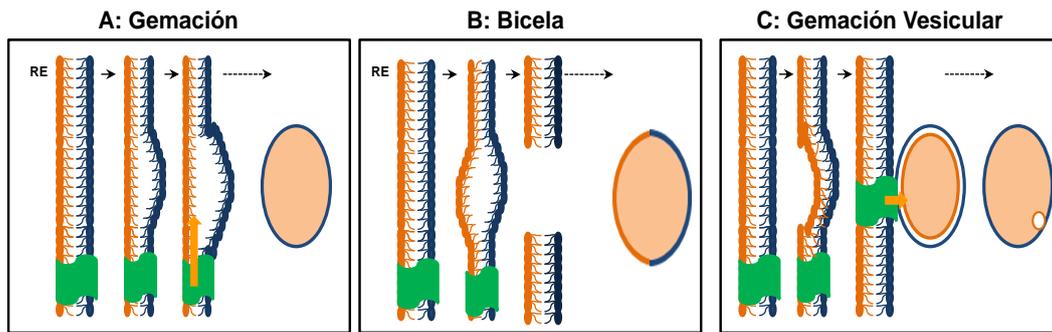


Figura 13. Formación de las gotas lipídicas. Las gotas lipídicas se forman a partir de zonas especializadas del RE donde se acumulan los triglicéridos. La formación de las gotas se puede realizar por gemación a partir de una de las hemicapas de la membrana del retículo (A), de la escisión de ambas hemicapas (B) o bien, a partir de la carga de triglicéridos en una vesícula (C). Figura modificada de (82)

2.3 Crecimiento de las gotas lipídicas

El tamaño de las gotas lipídicas depende del tipo celular, oscilando desde $1\mu\text{M}$ a $100\mu\text{M}$, por lo que deben de existir mecanismos que permitan el crecimiento de estos orgánulos. Se han propuesto varias posibilidades: i) que las gotas lipídicas se expandan en asociación con la membrana del RE, de manera que los lípidos podrían difundir libremente entre los dos compartimentos(105); ii) que las gotas lipídicas incorporen lípidos directamente, gracias a la acción de las enzimas DAGT que se encuentran en su superficie (83)(105); y iii) que las gotas lipídicas se fusionen entre sí. Este mecanismo ha sido ampliamente descrito y parece depender de las proteínas SNAREs y de los microtúbulos celulares (87).

2.4 Interacción de las gotas lipídicas con otros orgánulos

Además de interactuar con el RE, las gotas lipídicas también son capaces de interactuar con una gran variedad de orgánulos gracias a su asociación con microtúbulos (106). En músculo se ha visto la asociación entre gotas lipídicas y mitocondrias (107). Se ha sugerido que esta interacción podría favorecer la transferencia directa de ácidos grasos desde las gotas lipídicas a las mitocondrias, donde se utilizarían para generar energía mediante β -oxidación.

Se ha descrito interacción de las gotas lipídicas con peroxisomas. Esta asociación permite el movimiento bidireccional de lípidos entre ambos orgánulos (108).

Las gotas lipídicas también interaccionan con endosomas (109). En respuesta a ácidos se ha observado la existencia de un transporte de proteínas desde los endosomas hacia las gotas lipídicas. Este sería el mecanismo por el cual la caveolina, proteína de unión a ácidos grasos y colesterol, es transportada desde las caveolas de la membrana plasmática hasta las gotas lipídicas (108). Todo esto sugiere que las gotas lipídicas son unas estructuras altamente dinámicas.

2.5 Regulación de la biogénesis de las gotas lipídicas por fosfolipasas de tipo A₂

Las gotas lipídicas se pueden formar en las células por dos mecanismos principales muy diferentes entre sí. En primer lugar, las células producen gotas lipídicas en respuesta a las lipoproteínas presentes en el suero, o a ácidos grasos libres. Con ello intentan aumentar su reserva energética y protegerse contra la citotoxicidad de los ácidos grasos libres (79). En segundo lugar, muchos inductores de estrés celular, incluyendo la inflamación (110), la apoptosis inducida por fármacos(111), o la acidificación del medio (112), también inducen un incremento en la producción de gotas lipídicas, aunque el significado biológico de esta respuesta aún se desconoce.

Estudios recientes han demostrado que varias enzimas de la superfamilia de las fosfolipasas A₂, como la GIVAPLA₂ (fosfolipasa A₂ de grupo IVA) y la GVIPLA₂ (fosfolipasa A₂ de grupo VI), son proteínas clave en la generación de las gotas lipídicas por los mecanismos antes mencionados (113, 114, 115).

Las fosfolipasas A₂ son enzimas que hidrolizan la posición sn-2 de los fosfolípidos de las membranas celulares, liberando un ácido graso libre y el correspondiente lisofosfolípido. Esta superfamilia está formada por un gran número de proteínas muy diferentes que se pueden dividir en cinco grandes grupos atendiendo a su propiedades bioquímicas: secretadas dependientes de Ca²⁺ (sPLA₂), citosólicas dependientes de Ca²⁺(cPLA₂), citosólicas independientes de Ca²⁺ (iPLA₂), las acetil-hidrolasas del factor activador de plaquetas (PAF-AH) y las PLA₂ lisosomales (LPLA₂) (116, 117). La GIVAPLA₂ pertenece a la familia de las fosfolipasas A₂ citosólicas dependientes de Ca²⁺ de alto peso

molecular(118), también se conoce como cPLA₂α. La cPLA₂α es la única que tiene preferencia por AA en posición sn-2 de los fosfolípidos, lo que la hace una enzima clave en producción de mediadores lipídicos generados a partir de este ácido graso, como los eicosanoides(119). Por el contrario, la GVIPLA₂ es una fosfolipasa A₂ citosólica independiente de Ca²⁺ de alto peso molecular y no tiene especificidad por el ácido graso esterificado en posición sn-2 del fosfolípido (120). Nos referiremos a ella como iPLA₂.

El trabajo realizado por Gubern y colaboradores(113) muestra que el silenciamiento génico, o la inhibición farmacológica, de la cPLA₂α producen la inhibición de la formación de gotas lipídicas en células CHO-K1 estimuladas con suero, mientras que la sobreexpresión de esta proteína provoca el efecto contrario. El tratamiento con suero lleva asociado un aumento en la liberación de AA de las células, que es inhibido por MAFP (metil araquidonil fluorofosfonato) y pirrolidina, pero no por BEL (bromoenoil-lactona). El MAFP es un inhibidor covalente capaz de inhibir a la cPLA₂α y a la iPLA₂ (121), mientras que la pirrolidina y el BEL son inhibidores específicos de la cPLA₂α y la iPLA₂ respectivamente(121, 122). Por ello, estos datos sugieren que el suero estimula la actividad cPLA₂α, y con ello, la biogénesis de las gotas lipídicas. La fosforilación de la Ser⁵⁰⁵ de la cPLA₂α parece ser un paso importante para este proceso, puesto que la mutación en este residuo por una alanina impide la generación de gotas lipídicas. El mecanismo por el cual la cPLA₂α participa en la biogénesis de gotas lipídicas, no parece depender del papel del AA liberado en la síntesis de lípidos neutros, ya que experimentos realizados con AA radiactivo demostraron que el AA liberado en estas condiciones no se utiliza en la síntesis de TAG. Mediante microscopía electrónica se comprobó que la inhibición de la cPLA₂α por MAFP provoca una importante alteración de la estructura del RE, sugiriendo que la cPLA₂α participa en la formación de la gota lipídica naciente del RE. Todos estos datos sugieren que la cPLA₂α está implicada en la biogénesis de las gotas lipídicas inducida por suero, en un proceso dependiente de su fosforilación en la Ser⁵⁰⁵ y de la conformación del RE(113).

Durante la biogénesis de gotas lipídicas inducida por suero se ha observado la activación de las tres MAP (*Mitogen-activated protein*) quinasas, JNK, p38 y ERK. Estudios con inhibidores farmacológicos han revelado que JNK provoca la fosforilación de la cPLA₂α en estas condiciones. Además, la ceramida-1-fosfato parece inducir la biogénesis de gotas lipídicas mediante la fosforilación de JNK y cPLA₂α en este sistema ya que el MAFP y el SP600125 inhiben la generación de gotas lipídicas en respuesta a ceramida-1-fosfato. La sobreexpresión de la enzima ceramida quinasa (CERK) provoca un aumento en la producción de la ceramida-1-fosfato, en la fosforilación de JNK y cPLA₂α, en la liberación

de AA y en la biogénesis de gotas lipídicas; por el contrario, el silenciamiento de esta enzima inhibe la formación de gotas lipídicas. Todos estos datos sugieren que la biogénesis de gotas lipídicas inducida por suero está regulada por JNK y CERK(115)(Fig. 14).

La inducción de gotas lipídicas por estrés también lleva asociado un aumento del contenido de TAG celular y de la liberación de AA(114) . Ambos procesos son inhibidos por pirrolidina y BEL. Aunque por estos datos podría pensarse que el AA liberado estaría siendo utilizado para formar nuevas moléculas de TAG, experimentos realizados con AA radiactivo, han demostrado que esto no ocurre. Por el contrario, experimentos realizados con ácido palmítico radioactivo han indicado que la mayor parte de este ácido graso se utiliza para sintetizar TAG, en un proceso inhibido por BEL, pero no por pirrolidina. Estos datos sugieren que la iPLA₂ proporciona los ácidos grasos necesarios para incrementar la síntesis de TAG y gotas lipídicas en situación de estrés celular. Además hay un aumento de la fosforilación de la cPLA₂α, que también resulta necesaria en este contexto para generar nuevas gotas lipídicas. Puesto que el inhibidor BEL inhibe en gran medida la fosforilación de la cPLA₂α, es posible que la iPLA₂ actúe antes que la cPLA₂α en la biosíntesis de estos orgánulos. Por otro lado, el silenciamiento génico de la iPLA₂ reduce la expresión de la ADRP, la síntesis de TAG y la biogénesis de gotas lipídicas durante el estrés, pero no afecta a la biogénesis de gotas lipídicas inducida por suero. Por tanto, la iPLA₂ es requerida para la síntesis de TAG que tiene lugar durante la biogénesis de gotas lipídicas inducida por estrés celular (114).

Todos estos datos implican de manera directa a las PLA₂s en la regulación de la biogénesis de las gotas lipídicas

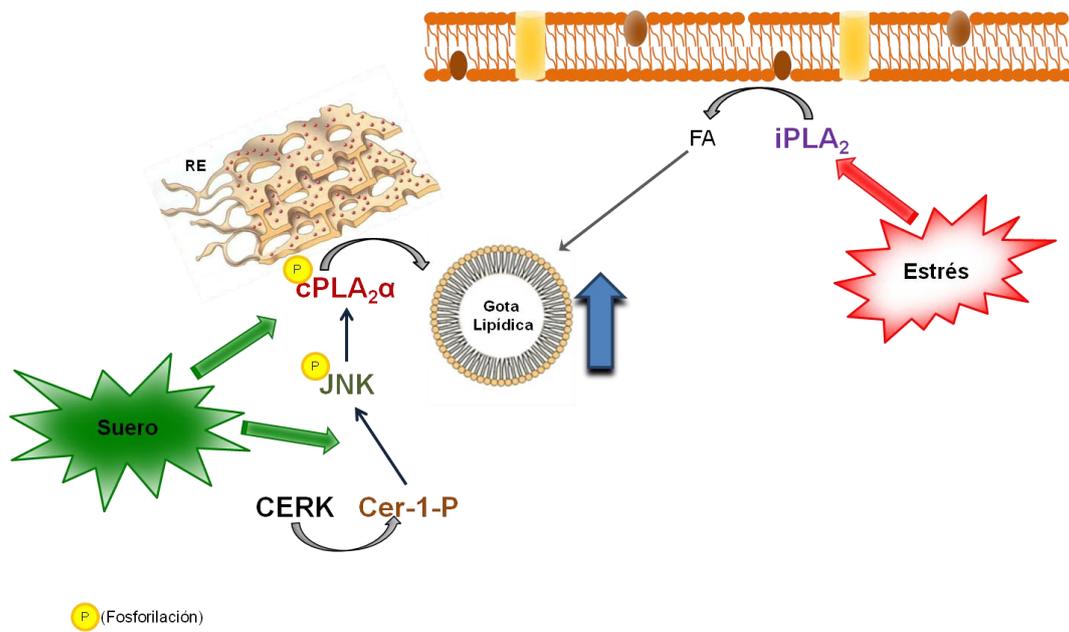


Figura 14. Regulación de la producción de gotas lipídicas por fosfolipasas A₂. Las fosfolipasas iPLA₂ y cPLA₂α participan en la biogénesis de gotas lipídicas inducida por estrés y por suero respectivamente

2.6 Implicación de las gotas lipídicas en el metabolismo celular

Se ha comprobado que las gotas lipídicas participan en multitud de procesos metabólicos (24, 79). En hepatocitos, los TAG y los ésteres de colesterol almacenados en gotas lipídicas se utilizan para el ensamblaje de las lipoproteínas de baja densidad(123). En las células retinoides del hígado la vitamina A y su metabolitos son almacenados en estos orgánulos (124). En las glándulas mamarias intervienen en la composición nutricional de la leche materna(125). En la corteza adrenal, testículos y ovarios las gotas lipídicas se utilizan para la síntesis de hormonas esteroideas. En pulmón proporcionan los metabolitos necesarios para la síntesis de sustancias surfactantes(79). En cardiomiocitos las gotas lipídicas son hidrolizadas para generar ligandos lipídicos que activan a PPARα y la función mitocondrial(126). También se ha propuesto a las gotas lipídicas como almacén de proteínas hidrofóbicas, para promover su degradación o evitar su agregación(127, 128).

Las gotas lipídicas tienen un papel fundamental en la homeostasis lipídica, en el gasto energético, y el exceso o defecto en la acumulación de estos orgánulos son características comunes de varias enfermedades humanas, como la diabetes, la arterosclerosis y el síndrome metabólico(36, 129)(129)Además, se ha comprobado que las gotas lipídicas juegan un papel importante en la patogénesis de varios virus y

bacterias(130). Todos estos estudios demuestran que las gotas lipídicas tienen un significado importante en biología y en el desarrollo de enfermedades metabólicas e infecciosas, y no son sólo un reservorio de energía.

2.7 Gotas lipídicas e inflamación.

Las gotas lipídicas parecen tener funciones importantes en las células del sistema inmune (131). En estas células se ha demostrado que las gotas lipídicas son sitios claves para la producción de eicosanoides proinflamatorios. La enzima responsable de la generación de AA, la cPLA₂ α se ha localizado en la superficie de las gotas lipídicas(132, 133), así como todas las enzimas involucradas en la síntesis de eicosanoides (131, 134), incluyendo ciclooxigenasas, (COX)(135), 5 y 15-lipooxigenasas (5-LO y 15-LO)(136), la prostanglandina E₂ sintetasa(137), y la leucotrieno C₄ sintetasa(136).

Las gotas lipídicas se han descrito como las principales localizaciones intracelulares de la producción de leucotrienos como el LTC₄, que se produce en eosinófilos durante los procesos alérgicos(138), el LCB₄ que se produce en neutrófilos y macrófagos durante los procesos de sepsis (139, 140), y el LTC₄ y el LTB₄ que se producen en macrófagos espumosos (141).

Durante el proceso inflamatorio que cursa con la infección de patógenos, como *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis BCG*(*bacillus Calmette-Guérin*) y *Trypanosoma cruzi* (*enfermedad de Chagas*), existe una correlación entre la formación de gotas lipídicas y la producción de prostanglandina E₂ en macrófagos (142, 143, 144).

Las gotas lipídicas, parecen jugar un papel activo en el metabolismo del AA(134), donde otros estudios también han demostrado que parece participar la actividad PAP1(75, 76). Todas estas premisas indican que podría existir una relación estrecha entre las lipinas, la cPLA₂ α y las gotas lipídicas en procesos inflamatorios.

OBJETIVOS

A la vista de los antecedentes descritos, el objetivo general de este trabajo es desvelar las posibles funciones celulares de la lipina en macrófagos humanos, haciendo especial énfasis en dos aspectos: por un lado, la expresión y localización subcelular de las proteínas de la familia lipina; y por otro, el papel de la lipina-1 sobre la regulación de enzimas implicadas en la formación de las gotas lipídicas.

Estos dos puntos pueden ser desglosados en varios objetivos más específicos:

- Determinar la expresión génica y proteica de la familia lipina en el proceso de maduración de monocito a macrófago.
- Estudiar la localización subcelular de las proteínas lipinas en macrófagos humanos, mediante sobreexpresión de quimeras de fusión con la proteína verde fluorescente.
- Definir el papel de la lipina-1 en el metabolismo lipídico de los macrófagos humanos, especialmente en la generación del último producto de la síntesis “de novo” lipídica, el TAG.
- Determinar la función de la lipina-1 en la biología de las gotas lipídicas y muy especialmente en la activación de enzimas que gobiernan su producción, como la cPLA₂α.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales y reactivos

AMAXA Biosystems (Maryland, EEUU): *Human macrophage nucleofector kit*

AnaSpec New Corporate (Fremont, CA, EE.UU): Anticuerpo IgG de conejo policlonal anti TIP47 (NT)

Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, EE.UU): Kit de ELISA específico para PGE₂

Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, EE.UU): anticuerpo IgG de conejo policlonal anti cPLA₂α murina/humana; Anticuerpo IgG de conejo policlonal anti cPLA₂α murina/humana fosforilada en la Ser505; Anticuerpo monoclonal de ratón anti HA-Tag

Clontech (Mountain View, CA, EE.UU): plásmidos pEGFP-N3; pECFP-1; pEF-HA; pmOrange

eBiosciences (San diego, CA, EE.UU): Anticuerpo IgG de conejo policlonal anti GFP

GE Health Care (Chalfont ST. Giles, Reino Unido): Anticuerpo de burro anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano; Anticuerpo de burro anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano; Proteína A conjugada con peroxidasa de rábano;

GenWay (San Diego, CA, EE.UU): Anticuerpo IgY de pollo policlonal anti ADRP

Life Technologies Corporation (Carlsbad, CA, EE.UU): Anticuerpo secundario anti IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor₅₅₅; Anticuerpo secundario anti IgG de pollo conjugado con Alexa Fluor₅₅₅; BODIPY 493/503; Lipofectamine® 2000; Rojo Nilo; Silencer® Select Negative Control siRNA; Silencer® Select LPIN1 siRNA

PROGEN Biotenik (Heidelberg, Alemania): Anticuerpo IgG de cerdo de guinea anti ADRP

2. Tampones y soluciones

Tampones y soluciones	
Tampón fosfato salino (PBS)	NaCl 136 mM KCl 2,7 mM Na ₂ HPO ₄ 8 mM KH ₂ PO ₄ 1,5 mM Se ajusta a pH 7,4
Tampón salino con Tween-20 (PBS-Tween-20)	PBS Tween-20 al 0,1%(v/v)
Tampón de lisis celular	NaCl 150 mM Tris-HCl 20 mM a pH 7,4 Triton X-100 0,5% (v/v) Antes de usar se añaden : PMSF* 1mM PIC* 1X Ortovanadato 100 µM
Tampón de homogenización para aislar gotas lipídicas	10mM HEPES* pH 7.4 5mM EDTA* Antes de usar se añaden: PMSF 1mM PIC 1X
Tampón de electroforesis para geles de agarosa	Tris-base 40mM Acético glacial 0,1% EDTA 1mM Se ajusta a pH 8.8
Tampón de electroforesis para geles de acrilamida	Tris 25 mM Glicina 0,2 mM SDS* 1g/l
Tampón de carga de Laemmli	Tris 60 mM Glicerol 10% (v/v) SDS 2% (p/v) Azul de bromofenol 0,002% (p/v) DTT 20 mM Se ajusta a pH 6,8
Gelvatol	2,4g Polyviny alcohol 10%Glicerol 2mM Tris pH8,5 2,2%DABCO
Medio de cultivo LB para bacterias	10g/l bactotripton 5g/l extracto e levadura 10g/l NaCl Se ajusta el pH 7 y se autoclava

(*)EDTA: etilendiamoniotetracetato de sodio; DTT: ditiotreitil; HEPES: ácido 4-(2-Hidoxietil)-Piperacil-Etanosulfónico]; PMSF: (fluoruro de fenilmetilsufonilo); PIC: inhibidores de proteasas (acrónimo del inglés *Protease Inhibitor Cocktails*); SDS: docecilsulfato de sodio;DABCO:1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano.

3. Métodos Experimentales

3.1 Animales.

Los ratones *fld* se adquirieron de los Laboratorios Jackson. Los animales fueron alimentados *ad libitum*, y se criaron para obtener ratones *fld* y heterocigotos (3). Para la realización de los experimentos sólo se usaron ratones machos y fueron realizados con conformidad a las normas establecidas por el animalario de la Universidad de Valladolid.

3.2 Cultivos de líneas celulares.

HEK293- Línea celular de fibroblastos humanos derivada de riñón embrionario tras la infección con el ADN 5 de un adenovirus. **U937**- Línea celular humana establecida a partir de un linfoma histiocítico difuso que muestra muchas características monocíticas.

Las células HEK 293 son adherentes, mientras que las U937 se cultivan en suspensión. Se cultivaron en medio DMEM y RPMI 1640 respectivamente, suplementados con 10% (v/v) suero bovino fetal inactivado por calor (20 min a 56º C) y 100 U/ml de penicilina-estreptomina. Además el DMEM se suplementó con 2mM de L-glutamina. Todas las células se mantuvieron en incubadores a 37º C, en una atmósfera saturada de humedad y con un 5% de CO₂.

Durante las dos horas previas al inicio de las estimulaciones, se eliminó el suero de las células para conseguir un estado de “quiescencia” en el momento comenzar el experimento.

3.3 Obtención de Macrófagos Peritoneales de Ratón.

Los ratones fueron sacrificados por dióxido de carbono y posterior dislocación cervical. Con la ayuda de tijeras y pinzas se abrió la piel abdominal con cuidado de no romper la capa epitelial que la rodea cavidad abdominal. A continuación, se inyectó en la cavidad dos veces consecutivas 5 ml de PBS frío con una jeringuilla con aguja de tamaño 25G (145, 146), y tras agitación suave se recogió el líquido intraperitoneal. Las células extraídas se centrifugaron a 290 x g durante 5 minutos y se plaquearon a razón de 250.000 células/pocillo sobre un cristal previamente colocado en pocillos de placas de 24,

si las células eran para experimentos de microscopía; y 500.000 células/pocillo en placas de 12 pocillos para el resto de ensayos. Las células se mantuvieron en medio RPMI 1640 suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal previamente inactivado por calor (20min a 56°C) y 100U/ml de penicilina/estreptomicina, a 37°C en atmósfera saturada de humedad y 5% CO₂ durante unas 16h, para permitir la adherencia de los macrófagos y enriquecerlos por sucesivos lavados con PBS.

3.4 Obtención de Monocitos y Macrófagos humanos

Las células sanguíneas humanas se obtuvieron a partir de concentrados de paquetes globulares (*buffy coats*) de voluntarios sanos del grupo sanguíneo O, proporcionados por el Centro Regional de Hemodonación y Hemoterapia de Castilla y León.

El concentrado sanguíneo se diluyó en la proporción 1:1 con PBS pH 7,4 y posteriormente se añadió sobre una solución de Ficoll-Paque™ Plus (*GE Healthcare*) manteniendo la proporción de sangre-PBS/Ficoll-Paque 3:1. Esta mezcla se centrifugó a 725 x g, sin freno, durante 30 min. Tras la centrifugación, se formaron varias fases: en la parte superior se situó la fase acuosa (plasma y PBS), un anillo de células mononucleares separa esta fase del Ficoll-Paque y en el fondo del tubo se situaron los eritrocitos y las células polimorfonucleares.

Las células mononucleares se recogieron mediante aspiración con pipeta Pasteur y se lavaron 3 veces con PBS mediante centrifugación a 450 x g, durante 10min. Tras el recuento, se resuspendieron en medio RPMI 1640 suplementado con 2mM de L-glutamina y 40 µg/ml de gentamicina, se distribuyeron 30x10⁶ células en placas de cultivo y se dejaron durante 2 h en el incubador para permitir la adherencia de los monocitos al plástico y su posterior separación de los linfocitos. Tras las 2 h, prácticamente la totalidad de los monocitos estaban adheridos a la placa y los linfocitos se pudieron eliminar mediante sucesivos lavados con PBS.

Para promover la diferenciación de los monocitos a macrófagos, las células se cultivaron durante 14 días en medio RPMI suplementado con 2 mM de L-glutamina, 40µg de gentamicina y 5% de suero humano procedente de una mezcla de donantes, realizándose cambios de medio cada 3 días (147).

3.5 PCR

El ARN de los macrófagos humanos fue extraído por el método del reactivo TRIzol, según el protocolo proporcionado por la empresa productora. Posteriormente se sintetizó ADN complementario (ADNc) usando la transcriptasa reversa M-MLV y 2µg de ARN total. Los ADNc se amplificaron por PCR en un termociclador (Mastercycler Personal *Eppendorf*) empleando los oligonucleótidos mostrados en la tabla 1 (63). Las condiciones estándar para la realización de las PCRs fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 95°C durante 10min, seguido de 35ciclos comprendidos cada uno de un paso de desnaturalización a 95°C durante 30segundos, un paso de hibridación 5°C menos que la T_m más pequeña de los oligonucleótidos (normalmente 55°C) durante 30segundos y un paso de amplificación a 72°C durante 30segundos por cada kilobase del fragmento amplificado y por último un paso de elongación a 72°C durante 10min para completar las posibles reacciones incompletas.

Para visualizar los fragmentos de ADN amplificados se utilizaron geles de agarosa al 1,5%(p/v) en tampón TAE (Tris-acetato-EDTA), al que se añadió bromuro de etidio al 0,5%. Las muestras se mezclaron con el tampón de carga y se corrieron en paralelo un patrón de marcadores de tamaño molecular conocido. La presencia del bromuro de etidio en el gel, permite detectar las bandas de ADN, debido a que este compuesto se intercala entre las bases de ADN y se hace visible bajo la luz ultravioleta de un transiluminador de BioRad con el que se tomaron imágenes.

Las reacciones de PCR cuantitativa en tiempo real (qRT_PCR) se realizaron en el termociclador *lightcycler 480* (Roche) utilizando una mezcla comercial, *KAPA SYBR Master mix qPCR* (Roche), que contiene SYBR green, Taq polimerasa, dNTPs y un tampón de reacción. La amplificación del producto fue verificada en todas las reacciones al analizar la curva de disociación al final de cada PCR. Todas las reacciones se realizaron por triplicado y el análisis de cuantificación se realizó mediante el método $\Delta\Delta Ct$ (148) comparando los valores de Ct de nuestro gen de interés con los valores de Ct de un gen constitutivo de referencia, en nuestro caso, se utilizó la ciclofilina.

Gen	Oligonucleótidos
CICLOFILINA	5'-CAGACAAGGTCCCAAAGACAG-3' (sentido) 5'-TTGCCATCCAACCACTCAGTC-3' (antisentido)
<i>LPIN-1</i> (total)	5'-TGCTGGAGAGCAGCAGAACTC -3' (sentido) 5'-TAGGGTATGAGGCTGACTGAG-3' (antisentido)
<i>LPIN-1α</i>	5'-TGCTGGAGAGCAGCAGAACTC -3' (sentido) 5'-GAACCGAAGGACTGGGAGTG-3' (antisentido)
<i>LPIN-1β</i>	5'-TGCTGGAGAGCAGCAGAACTC -3' (sentido) 5'-AAGACTGTGGAGGGCAAGAAC -3' (antisentido)
<i>LPIN-2</i>	5'-CCTCTCCTCAGACCAGATCG-3' (sentido) 5'-GGAGAATCTGTCCCAAAGCA-3' (antisentido)
<i>LPIN-3</i>	5'-CACTCCACCCTCCACTCCTA-3' (sentido) 5'-ACAGGTAGATGGTGGCCTTG-3' (antisentido)
<i>MCR-1</i>	5'-CACTGGGACTCACTGCATCC-3' (sentido) 5'-GCTCCTGGTTTTGCTCTGA-3' (antisentido)

Tabla 1 Oligonucleótidos utilizados para la realización de PCR y qRT-PCR. Los oligonucleótidos fueron adquiridos de la base de datos PrimerBank y fueron sintetizados por MWG Biotech (Ebersberg, Alemania).

3.6 Construcciones y mutagénesis dirigida

El ADNc de la lipina-1 α humana se compró en Origene (SC125492) y fue clonado en el vector p-EGFP-N3 usando los sitios de corte para XhoI y PstI. Esta construcción, lipina-1 α -EGFP, produce una proteína de fusión de la lipina-1 α en cuyo extremo C-terminal se une la EGFP.

La lipina-1 α se mutó en el motivo responsable de su actividad, reemplazando el ácido aspártico de la posición 678 por un ácido glutámico (D678E)(18) mediante el *kit* de mutagénesis dirigida QuickChange XL (*Stratagene Agilent Technologies Company*), con los oligonucleótidos indicados en la siguiente tabla:

Secuencia sentido	5'-GGGATGATAAAGTCATCATTCTGAGATTGATGGGACAATTACCAG-3'
Secuencia antisentido	5'-CTGGTAATTGTCCCATCAATCTCAGAAATGATGACTTTATCATCCC-3'

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para producir el mutante lipina-1 α -D678E-EGFP. Los oligonucleótidos fueron diseñados por el programa Oligo 6.0 (Molecular Biology Insights, Cascade, CO, EE.UU.) y sintetizados por MWG Biotech (Ebersberg, Alemania).

La construcción de la lipina-1 β se consiguió mediante la inserción de 108 nucleótidos en la secuencia de la lipina1 α (7). El inserto se obtuvo por PCR a partir de un ADNc de macrófago humano, utilizando los oligonucleótidos indicados en la tabla 3. El inserto se introdujo en la construcción lipina-1 α -EGFP, usando las enzimas de restricción BstEII y HindIII. El inserto se secuenció y se confirmó que correspondía a la secuencia que se describió para la lipina-1 β humana (7)

Secuencia sentido	5'-GGATGAAGAGTGGTCACCCAC-3'
Secuencia antisentido	5'-AAGACTTGACAGCCTGCGGCA-3'

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para producir el inserto necesario para generar el plásmido lipina-1 β -EGFP. Los oligonucleótidos fueron diseñados por el programa Oligo 6.0 (Molecular Biology Insights, Cascade, CO, EE.UU.) y sintetizados por MWG Biotech (Ebersberg, Alemania).

La construcción hemaglutinina (HA)-lipina-1 α se obtuvo cortando la secuencia de la lipina-1 α del plásmido lipina-1 α -EGFP, usando las enzimas EcoRI y XbaI e introduciendo dicha secuencia en el vector pEF-HA.

El ADNc de la lipina-2 humana se adquirió en DNAsu (Arizona States University, EE.UU; clon ID HSCD00295181) y el de la lipina3 se compró a Thermo Fisher Scientific (Clon ID 9021674). Las bacterias conteniendo el plásmido con el ADNc se crecieron en medio LB durante 16 horas a 37°C y el plásmido se purificó mediante por MaxiPrep de Quiagen. Las secuencias se amplificaron por PCR, usando oligonucleótidos cuyos extremos contenían las secuencias de corte para las enzimas de restricción Sall y BamHI, en el caso de la lipina-2, y XhoI y EcoRI en el caso de la lipina-3. El fragmento obtenido en cada caso se clonó en el vector pEGFP-N3 usando los mismos sitios de corte mencionados. Las

construcciones resultantes, lipina-2-EGFP y lipina-3-EGFP, producen una proteína de fusión donde la EGFP se une al extremo C-terminal de la lipina.

Gen	Oligonucleótidos	
<i>LPIN-2</i>	Sentido (Sall)	5'-CACACAG <u>TCGAC</u> ATGAATTATGTGGGACAGCTG-3'
	Antisentido (BamHI)	5'-CACACAG <u>GATCC</u> AGACAGGTCATCCAGGTCCA-3'
<i>LPIN-3</i>	Sentido (XhoI)	5'-CACACAG <u>TCGAG</u> ATGAACTACGTGGGGCAGC-3'
	Antisentido (EcoRI)	5'-CACACAG <u>AATTC</u> AAGTCCAGGGTATCAAGGTCCAC-3'

Tabla 4. Oligonucleótidos usados para la construcción de los plásmidos lipina-2-EGFP y lipina-3-EGFP. Los oligonucleótidos fueron diseñados por el programa Oligo 6.0 (Molecular Biology Insights, Cascade, CO, EE.UU.) y sintetizados por MWG Biotech (Ebersberg, Alemania).

En todos los casos las construcciones se comprobaron por secuenciación.

3.7 Transfecciones

3.7.1 Transfecciones de vectores

Para expresar las distintas proteínas de fusión fluorescentes en células HEK 293 se utilizó el transporte de plásmidos complejo a lípidos catiónicos como método de transfección, en concreto se utilizó la Lipofectamine® 2000 (Invitrogen, *Life Technologies Corporation*) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los macrófagos humanos se transfectaron mediante nucleofección. Para ello se trataron con tripsina durante 90 min, se rasparon muy suavemente y se centrifugaron a 200 x g durante 10 min. Posteriormente, se lavaron con PBS para eliminar los restos de tripsina. A continuación, se resuspendieron en 100 µl de la solución de nucleofección apropiada y se añadió 3 µg del plásmido, se les aplicó el programa Y-010 del Nucleofector (*Amaxa*) y posteriormente se añadieron 400 µl de “medio libre de suero para macrófagos” (*GIBCO®*, *Invitrogen™*) suplementado con 5% suero humano inactivado. La expresión de las proteínas fluorescentes se comprobó a las 24h mediante microscopía de fluorescencia.

3.7.2 Silenciamiento génico por ARN pequeño de interferencia (siRNA)

Para el silenciamiento génico de los macrófagos humanos se usaron Silencer® Select siRNAs (Ambion) específicos para cada proteína. Para el gen LPIN1 (4390817), se

utilizó la secuencia sentido GGAGUGUCUUUGAAUAGAA_{tt} y la secuencia antisentido UUCUAUCAAAGACACUC_{ta}. También se utilizó un siRNA negativo (4390847) como control de silenciamiento. La transfección se realizó mediante nucleofección (Amaxa) de la misma forma que para transfectar plásmidos, usando 20 nM de concentración final de siRNA. Posteriormente, los macrófagos se resuspendieron en “medio libre de suero para macrófagos” (GIBCO®, *Invitrogen*TM) con 5% de suero humano inactivado y se mantuvieron en cultivo durante 48 horas.

3.8 Obtención de homogenizados celulares para su análisis por inmunoblot (Western-Blot).

Las células se lavaron dos veces con PBS y se recogieron mediante raspado en un medio de lisis (150mM NaCl, 20mM TrisHCl [pH 7,4] y 0,5% Triton X-100). Posteriormente se incubaron en hielo durante 20 minutos y el lisado celular se centrifugó a 16000 x g a 4°C durante 10 min. La proteína presente en el sobrenadante se cuantificó y se añadió tampón de carga de Laemmli. Finalmente las muestras se hirvieron durante 5 minutos antes de proceder a su separación electroforética (SDS-PAGE).

3.8.1 Valoración de la concentración de proteína

Para determinar la cantidad de proteína total de los lisados celulares se utilizó el ensayo del ácido bicinonónico (BCA) (149), siguiendo las indicaciones proporcionadas por el fabricante (*Thermo Fisher Scientific*). La recta de calibrado se realizó con diluciones de albúmina de suero bovino (BSA).

3.8.2 Inmunoblot de proteínas (Western blot)

La electroforesis se realizó en condiciones desnaturizantes y reductoras, según el método descrito por Laemmli (150), donde las proteínas se separan en función de su tamaño. Se utilizaron geles con diferentes porcentajes de acrilamida en función del tamaño de la proteína a estudiar y un tampón de electroforesis con 25 mM de Tris, 0,2 M de glicina y 1% de SDS (p/v). Además se usaron estándares proteicos preteñidos de diferentes tamaños moleculares, lo cual permitió la localización de las proteínas en función de su peso molecular. Las proteínas se transfirieron del gel a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) mediante un sistema de transferencia Bio-Rad, a 300

mA durante 60 ó 90 min, en función del grosor del gel y del tamaño de la proteína, utilizando el tampón de transferencia CAPS 1mM, pH 11.

Para disminuir la adsorción inespecífica del anticuerpo primario a la membrana de PVDF se incubó la membrana en una solución rica en proteínas compuesta por PBS y 5% (p/v) de leche desnatada. La incubación se realizó en agitación suave durante 1 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C.

Para el inmunoblot de las proteínas, las membranas fueron incubadas en agitación lenta con el anticuerpo primario correspondiente diluido 1:1000 en la solución de bloqueo (PBS-0,1% Tween-20 suplementado con 5% de leche y 0,025% de timerosal), durante una hora a temperatura ambiente, o durante toda la noche a 4°C. Seguidamente se realizaron tres lavados con PBS-0,1% Tween-20 al con el fin de eliminar el exceso de anticuerpo primario no adherido específicamente a la membrana. Posteriormente se incubó la membrana con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa diluido 1:5000 en PBS-0,1% Tween-20 suplementado con 0,5% de leche desnatada, durante 1 h, a temperatura ambiente y en agitación lenta. Tras la incubación, se realizaron de nuevo tres lavados con PBS-0,1% Tween-20 para eliminar el anticuerpo secundario no adherido específicamente a la membrana.

Finalmente, las membranas se incubaron con el reactivo comercial ECL, que permite la detección quimioluminiscente de los anticuerpos conjugados a peroxidasa, monitorizándose en un sistema de captura de imágenes digital VersaDoc 5000 (BioRad). Las imágenes digitales resultantes fueron analizadas con el software Quantity One (v4.5.2, Biorad). La densitometría cuantitativa de las bandas se realizó utilizando diferentes tiempos de exposición y los datos de las gráficas se representaron como la media \pm desviación estándar, asignándose el valor de 100 al control y relativizando el resto de puntos a esta referencia.

3.8.3 Fraccionamiento subcelular

Para poder separar las gotas lipídicas del resto de componentes celulares, las células se rasparon en un medio de homogenización (10mM HEPES [pH 7.4], 5mM EDTA). La lisis se realizó mecánicamente a través de 35 pases sucesivos con una jeringuilla con aguja de tamaño 25G. Los lisados se centrifugaron a 50.000 x g durante 30 min en una ultracentrífuga (Optima TL; Beckman Coulter). Se obtuvieron tres fases; un pellet que

corresponde a membranas, una fase soluble que corresponde al citosol y una parte superior que corresponde a la fracción de gotas lipídicas. La fracción de gotas lipídicas se recogió usando una pipeta *pasteur* y las proteínas se obtuvieron por precipitación con acetona(151). Posteriormente se analizaron por inmunoblot junto con una muestra de homogenizado total, citosol y membranas.

3.9 Microscopía Confocal

Para el análisis de la localización subcelular de las proteínas fluorescentes, las células, una vez transfectadas, fueron depositadas sobre cristales y cultivadas en medio RPMI 1640 con 5% de suero humano inactivado. Posteriormente, las células fueron fijadas con una solución de PBS con 4% (p/v) de paraformaldehído y 3% (p/v) de sacarosa durante 20min a temperatura ambiente. Tras varios lavados con PBS, los cristales se montaron con Gelvatol.

Para teñir las células por inmunocitoquímica, las células una vez transfectadas se depositaron sobre cristales y se cultivaron durante 24h. Tras el paso de fijación descrito anteriormente, las células fueron permeabilizadas con una solución 0,1% de Triton X-100 durante 2 min. Se lavaron 3 veces con PBS y se trataron con una solución de bloqueo (PBS 0,2% (p/v) BSA, 100mM glicina y 10% de suero de cabra o del animal que procedan los anticuerpos secundarios) durante 30min (152), para reducir la unión inespecífica de los anticuerpos. A continuación, las células se incubaron con el anticuerpo primario diluido en la solución de trabajo (solución de bloqueo diluida en PBS 1:5) durante 1 h. Después se lavaron 3 veces con PBS y 2 veces con la solución de trabajo. Posteriormente se incubaron durante 1h con el anticuerpo secundario diluido en la solución de trabajo. Se lavaron 3 veces con PBS y se tiñeron con 1µg/ml de DAPI para marcar los núcleos. Se lavaron 3 veces más con PBS y se montaron los cubres con Gelvatol.

Para el análisis de las gotas lipídicas, las células se marcaron con 2,5µg/ml BODIPY 493/503 o 100ng/ml Rojo Nilo en PBS durante 5min antes del montaje en el portaobjetos.

Para llevar a cabo la tinción del retículo endoplásmico, se utilizó ER-Tracker™-Red (Invitrogen, *Life Technologies Corporation*) a 500nM. Una vez transfectadas las células y cultivadas sobre cristales, se lavaron con medio DMEM y se incubaron con 500nM de ER-Tracker™-Red en medio DMEM durante 40min a 37°C. A continuación, se lavaron una vez con medio DMEM y otra con PBS, se fijaron y por último se lavaron PBS y se montaron.

Para realizar esta tinción en célula viva, las células transfectadas se sembraron en placas con el fondo de vidrio (MatTek, Ashland, MA) y la tinción se realizó en la solución salina balanceada de Hank (HBSS) con 1,3 mM CaCl_2 y 1,3 mM MgCl_2 mientras se monitorizaba por microscopía confocal.

El análisis de colocación de las lipinas con otras proteínas u orgánulos se llevó a cabo mediante el *software* ImageJ 1.44. El índice de colocación o el coeficiente de Pearson (CP), está comprendido entre -1 y 1. Los valores positivos indican que existe colocación, cuanto más cercano al valor 1 mayor será la correlación, en cambio, los valores negativos indican que no existe colocación.

- **Ensayo de protección de la fluorescencia frente a proteasa**

Este ensayo permite evaluar la posición que ocupa una proteína fluorescente en una membrana lipídica. Esta técnica se basa en la inaccesibilidad de proteasas a regiones intracelulares en células previamente permeabilizadas. Para permeabilizar la membrana plasmática se utiliza el detergente digitonina, que se une al colesterol de las membranas y lo libera de ellas. En relación con el resto de membranas celulares, la membrana plasmática contiene una mayor proporción de colesterol. Basándose en este principio la digitonina permeabilizará selectivamente la membrana plasmática. La permeabilización permite la entrada de proteasas como tripsina añadidas de forma exógena al interior celular, que degradará las proteínas (fluorescentes o no) que se encuentren en el citosol. Todas las proteínas que estén en el interior de un orgánulo quedaran protegidas de la acción de la tripsina (**Fig. 15**).

Los macrófagos humanos se transfectaron con el plásmido lipina-1 α -EGFP y las células se plaquearon sobre placas de cultivo con fondo de vidrio (MatTek, Ashland, MA) en medio RPMI 1640 con 40 mg/ml gentamicina y 5% de suero humano inactivado. Tras 24h, se reemplazó el medio por una solución que contenía 110 mM acetato potásico, 20mM HEPES y 2mM MgCl_2 y se monitorizó la fluorescencia mediante microscopía confocal a 37°C antes y después de añadir 20 μM digitonina y 4 μM de tripsina, para comprobar si desaparece o no la fluorescencia de la EGFP (153)

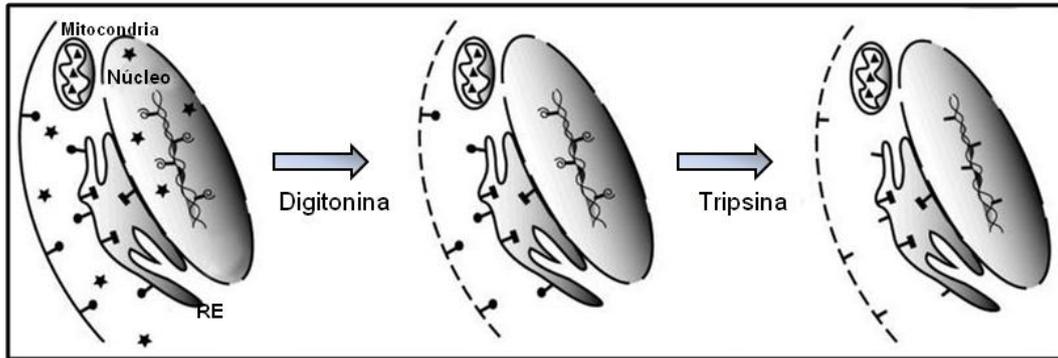


Figura 15. Ilustración del ensayo de Protección de la fluorescencia frente a proteasa. En la imagen se representan diferentes proteínas fluorescentes solubles o de membrana. Al añadir la digitonina se permeabiliza la membrana plasmática y se produce la liberación de proteínas solubles del citosol y núcleo, pero las proteínas unidas a membranas o unidas al ADN permanecerán intactas. La incubación con la proteasa tripsina provoca la digestión de todas las proteínas fluorescentes que no están protegidas por una membrana lipídica. Por ejemplo, las proteínas que se encuentran en el lumen de mitocondrias o del retículo endoplásmico quedan protegidas de la acción de la tripsina, sin embargo, la fluorescencia de las proteínas asociadas a la cara citólica de dichos orgánulos desaparecerá. Figura modificada de (154).

Para monitorizar la fluorescencia de todos los experimentos por microscopía confocal se utilizó un sistema de escaneo de láser BioRad Radiance 2100, acoplado a un microscopio invertido Nikon TE-2000U equipado con una cámara termostatazada para placas de 35 mm (Warner Instruments), para el caso de experimentos *in vivo*. Para la fluorescencia en verde (EGFP, BODIPY493/503, Alexa 488) se utilizó un láser de argón 488nm y una combinación de filtros HQ500 *long band pass* y HQ560 *short band pass* y para la fluorescencia roja (Rojo Nilo, Alexa 555, ER-Tracker-Red) se usó un láser de Helio/Neón 573nm con el filtro HQ570 *long band pass*.

Los últimos experimentos de microscopía confocal están realizados en un confocal Leica TCS SP5X con laser blanco. Para monitorizar el DAPI se usó un láser de Diodo azul de 405nm, para la fluorescencia verde se usó la línea láser *Supercontinuum* visible de 485nm y para la fluorescencia roja la línea láser *Supercontinuum* visible de 588nm.

3.10 Cuantificación de las gotas lipídicas.

- **Análisis de fluorescencia de las gotas lipídicas por citometría de flujo.**

El análisis de las gotas lipídicas celulares por citometría de flujo se realizó en células teñidas con 0,2 µg/ml BODIPY 493/503, usando el detector FL1 del citómetro de flujo *Gallios*. La fluorescencia se midió en escala lineal.

- **Oil Red O**

El Oil Red O es un colorante que se une a lípidos neutros. Para cuantificar las gotas lipídicas con este método, en primer lugar se fijan las células con 10% paraformaldehído en PBS durante 5min a temperatura ambiente. A continuación se realiza un lavado con una solución de isopropanol al 60%, se añade una solución de trabajo de Oil Red O (ver más abajo) durante 10min y pasado dicho tiempo se elimina todo el colorante y se realiza varios lavados con agua y se fotografían. Por último se retira el colorante unido a las células con una solución de isopropanol al 100% y se mide la absorbancia a 500nm. El valor de la absorbancia a 500nm es proporcional al contenido de lípidos que tienen las células(155).

La solución de trabajo de Oil Red O, se prepara mezclando 6 partes de una solución madre de Oil Red-O (0,7g Oil Red + 200 ml de isopropanol) con cuatro partes de agua, se deja reposar durante 20min y a continuación se filtra.

3.11 Ensayo de liberación de AA

Para medir la actividad “*in vivo*” de la cPLA₂α se cuantificó el AA liberado al medio extracelular. Para ello los macrófagos humanos se marcaron con 0,5 µCi [³H]AA en medio RPMI 1640 incompleto con 0,5 mg/ml de BSA y 1% de ITS (suplemento con insulina, transferrina y selenio), durante toda la noche a 37^o C, tiempo óptimo para una eficiente incorporación de [³H]AA en los fosfolípidos de membrana. Tras el marcaje, las células se lavaron dos veces con una solución con 0,5 mg/ml de BSA deslipidada en PBS y se estimularon en el mismo medio durante el tiempo deseado(152, 156, 157)
(158)

Posteriormente se recogieron los sobrenadantes celulares (aprox. 1 ml), se centrifugaron a 16000 x g durante 2 min y se recogieron 800 µl del sobrenadante. En paralelo, se añadió 1 ml de 0,05% Triton-X-100 a las placas de cultivo y el lisado celular se recogió para cuantificar el [³H]AA total incorporado en los fosfolípidos de membrana. Finalmente se determinó la radiactividad presente en los sobrenadantes y en los lisados celulares añadiendo los 800 µl de cada muestra a tubos de contaje que contenían 3 ml de líquido de centelleo. La cuantificación de la radiactividad se realizó en un contador de centelleo líquido LS 6500 (Beckman Coulter) y los resultados se expresaron en función del porcentaje de [³H]AA liberado respecto al total de [³H]AA incorporado a las células.

3.12 Extracción de lípidos y separación de TAG en TLC

Los macrófagos humanos o macrófagos peritoneales de ratón fueron tratados con 0,5 µCi [¹⁴C] ácido oleico durante diferentes tiempos en medio RPMI 1640. La fracción lipídica de las células se obtuvo mediante extracción con cloroformo/metanol (1:2, v/v) según el método de Bligh y Dyer (159). La fase orgánica que contiene los lípidos se evaporó en una centrífuga con vacío, se resuspendieron en cloroformo/metanol (2:1, v/v) y se separaron mediante cromatografía en capa fina (TLC) en un sistema que contenía n-hexano/dietileter/acido acético (70:30:1, v/v/v). Se corrieron paralelamente estándares lipídicos apropiados. Los puntos correspondientes a los TAG se rasparon y se añadieron a tubos de contaje que contenían 3 ml de líquido de centelleo. La radiactividad se cuantificó en un contador de centelleo líquido LS 6500 (Beckman Coulter). Los resultados se expresaron en unidades de radiactividad dpm (desintegraciones por minuto).

3.13 Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

La composición en ácidos grasos de las distintas familias de lípidos celulares (DAG, TAG...), se analizó por espectrometría de masas. Para ello, Las distintas familias de lípidos se separaron primero por TLC, se rasparon y se disolvieron en 50µl de cloroformo/metanol 2:1 v/v. Después se transmetilaron mediante tratamiento con 0,5 M KOH en metanol durante 30 min a 37°C en agitación. La reacción se neutralizó añadiendo un volumen de 0,5 M HCl, y los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAMEs) se extrajeron dos veces con un volumen de hexano. Esta fase orgánica se guardó a -80 °C en atmósfera de N₂ hasta su análisis.

El análisis de los ésteres metílicos obtenidos se realizó en un cromatógrafo de gases (Agilent 6890N) dotado de un espectrómetro de masas como detector (Agilent 5975 MS) en modo de impacto electrónico (EI, 70 eV), equipado con un inyector automático (Agilent 7693 autosampler) y una columna capilar (Agilent DB-23)[(50%-cianopropil)-metilpolisiloxano] de 60 m x 250 μm D.I. x 0,15 μm (grosor de película). El programa de temperatura utilizado, detallado a continuación, es una modificación del descrito por Abu *et al* (160).

La temperatura del inyector (*inlet*) se mantuvo a 250 $^{\circ}\text{C}$. La temperatura del horno se programó a 50 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 min, se incrementó hasta 175 $^{\circ}\text{C}$ a 25 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, y posteriormente hasta 230 $^{\circ}\text{C}$ a 2,75 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. La temperatura final se mantuvo 5 min, siendo el tiempo total de la carrera 33 min. La temperatura de la línea de transferencia del espectrómetro de masas se programó a 250 $^{\circ}\text{C}$, y la del cuadrupolo y la fuente del MS a 150 $^{\circ}\text{C}$ y 230 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Se utilizó He como gas portador, a una presión constante de 180KPa. En cada caso se inyectó 1 μl de muestra en modo *splitless* (sin división de la muestra).

La adquisición de datos se realizó en modo scan para la identificación de compuestos, y en modo SIM (monitorización de iones seleccionados) para la cuantificación. La identificación de compuestos se realizó usando el tiempo de retención característico para cada FAME, así como la librería de espectros NIST (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología). Para la cuantificación en modo SIM se usaron los siguientes fragmentos: 74 y 87 para FAMES saturados, 83 para monoinsaturados, 67 y 81 para diinsaturados, y 79 y 91 para poliinsaturados.(161).

Para la cuantificación se utilizó como estándar interno un ácido graso de cadena impar (C17:0) que no está presente en las células y cuya concentración es conocida (10 nmoles). Se llevó a cabo por tanto, una recta de calibrado del ácido graso control con diferentes concentraciones en función de la integral del pico correspondiente detectado. La identificación de cada ácido graso se realizó gracias al tiempo de retención característico de cada ácido graso y al uso de librerías de espectros (NIST y Wiley). El *software* utilizado fue MSD Productivity Chemstation, G1701EA, revisión E.02.00 SP2 (G1701-64553).

3.14 Análisis de especies de fosfolípidos mediante cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS).

La separación cromatográfica de los fosfolípidos se realizó en un sistema de HPLC compuesto por un sistema de bombas binario con desgasificador en línea y régimen de gradiente Hitachi LaChrom Elite L-2130 (Merck) y un inyector Hitachi Autosampler L-2200 (Merck) acoplado a un espectrómetro de masas de trampa iónica Bruker Esquire 6000® (Bruker Daltonics). El efluente procedente del HPLC fue dividido, dejando entrar un flujo de 0,2 ml/min a la cámara de electronebulización (ESI) del espectrómetro de masas con un caudal del gas de secado a 4 l/min y una temperatura de secado a 350 °C. La calibración de la trampa iónica se realizó mediante el protocolo del propio equipo con la solución *Tuning Mix* (Agilent). El análisis de los fosfolípidos que contenían AA se realizó tal y como está descrito (162, 163).

3.15 Cuantificación de PGE₂

Los macrófagos humanos tratados con siRNA durante 48 horas fueron estimulados con 1mg/ml de zymosan opsonizado. Tras 18h de estimulación, se recogieron los sobrenadantes y se midió PGE₂ usando un ELISA comercial (*Cayman*) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. El ELISA se basa en la competición entre la PGE₂ de la muestra y una PGE₂ asociada a una enzima trazadora. El producto de esta reacción enzimática es de color amarillo y fue monitorizado a una longitud de onda de 412 nm en placas de 96 pocillos en el espectrofotómetro VERSAmax (Molecular Devices). La señal obtenida es inversamente proporcional a la cantidad de PGE₂ sin conjugado presente en el pocillo. Cada punto fue repetido tres veces por experimento, los datos de la gráfica se representa como la media ± desviación estándar de tres experimentos independientes.

3.16 Preparación de diferentes estímulos

- **Preparación del zymosán**

Se partió de una preparación comercial de zymosán-A procedente de *Sacharomyces cerevisiae* que se diluyó a 20 mg/ml en agua destilada hasta obtener una solución homogénea. Posteriormente, se hirvió durante 10 min y una vez enfriado, se centrifugó a 2.000 x g durante 5 min. Se decantó el sobrenadante y el precipitado se lavó tres veces con PBS estéril a pH 7,4. Finalmente, se resuspendió en PBS y se almacenó a -20°

C. Antes de su utilización el zymosán se sonicó durante 15 segundos para facilitar la separación de las partículas.

- **Opsonización de Zymosan**

El zymosán opsonizado se preparó mediante incubación con una mezcla de suero humano durante 20 min a 37° C, en proporción 1 ml de suero por cada 3 mg de zimosán. Tras la incubación, se lavó el precipitado tres veces con PBS y se sonicó en medio incompleto durante 15 segundos.

- **Ácido Oleico**

Se hizo una disolución 200mM de ácido oleico (Sigma) en etanol. Antes de añadir a las células se compleja con BSA (3,3mM) en una relación 1:5 a temperatura ambiente durante 15min. Para inducir la formación de gotas lipídicas se usó una concentración 200µM complejo con 40µM de BSA. El resto de los tratamientos se utilizó a 100µM.

3.17 Análisis Estadístico

Los datos presentados en este trabajo son resultados representativos de al menos dos o tres experimentos independientes, realizados por triplicado. Los datos de las gráficas se representaron como la media \pm desviación estándar. En algunos casos se realizó el análisis estadístico *t de student*. Las diferencias entre los grupos experimentales se consideraron estadísticamente significativas a partir de un nivel de confianza superior al 95% ($P < 0,05$).

RESULTADOS

1. Expresión de la familia lipina

1.1 Expresión de las lipinas en monocitos y macrófagos.

En los últimos años se están llevando a cabo numerosos estudios sobre el papel que desempeña la familia lipina en el metabolismo celular, especialmente en tejidos metabólicamente relevantes, pero se conoce muy poco sobre la importancia de estas proteínas en el sistema inmune. El presente estudio se inició analizando mediante técnicas de PCR la expresión de ARNm para cada uno de los miembros de la familia lipina en monocitos y macrófagos humanos derivados de monocitos de sangre periférica (**Fig. 16**). Los resultados mostraron que las lipinas -1 α , -1 β , -2 y -3 se expresan de forma constitutiva en ambos tipos celulares.

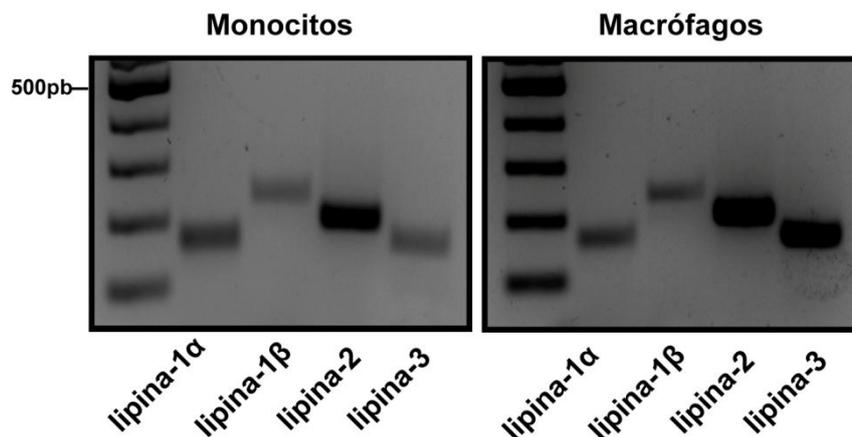


Figura 16. Expresión génica de la familia lipina en monocitos y macrófagos humanos analizados por PCR. El ARN total de las células indicadas fue extraído utilizando el método de TriZol y se sintetizó el ADNc como se indica en materiales y métodos. Se realizaron PCRs, usando oligonucleótidos específicos para cada isoforma de lipina indicada, y los fragmentos amplificados se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,5%.

1.2 Expresión de la familia lipina en la diferenciación de monocito a macrófago

La diferenciación de monocito a macrófago se lleva a cabo *in vitro* en el laboratorio en presencia de 5% de suero humano inactivado durante 14 días (**Fig. 17**). Dicho proceso supone un gran cambio celular. Por ejemplo, la célula aumenta su tamaño de 5 a 10 veces, sus orgánulos aumentan tanto en número como en complejidad y adquiere capacidad fagocítica. Uno de los cambios más llamativos es el aumento de gotas lipídicas, fácilmente

identificables incluso por microscopía de campo claro (**Fig. 17B**). Esta acumulación de lípidos podría deberse a que los macrófagos, al ser células fagocíticas, necesitan una renovación continua de la membrana celular. Puesto que las lipinas son enzimas clave en el metabolismo lipídico, se planteó estudiar con profundidad tanto los niveles de proteína lipinas por inmunoblot, como los niveles de expresión de ARNm para cada una de ellas mediante PCR cuantitativa durante el proceso de maduración de monocito a macrófago.

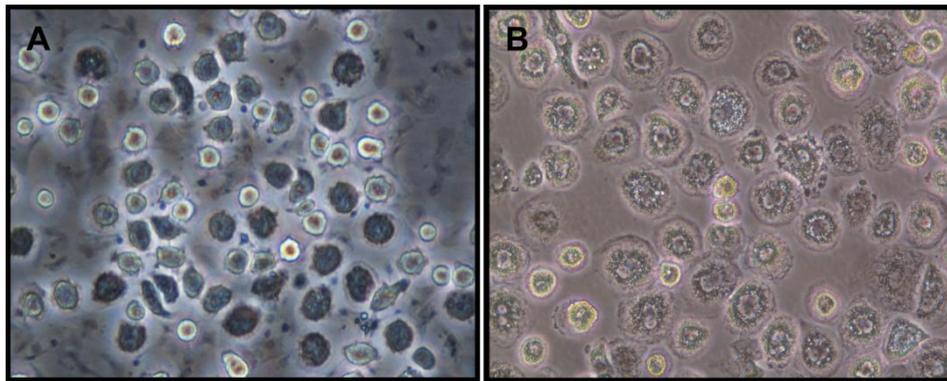


Figura 17. Morfología de los monocitos y macrófagos humanos. Imágenes de microscopía de campo claro con el objetivo 40X de monocitos (A) y macrófagos humanos diferenciados durante 14 días (B).

Para detectar la proteína lipina-1 por inmunoblot se utilizó un antisuero policlonal de conejo diseñado en el laboratorio que reconoce en macrófagos una banda de 130 kDa, a pesar de que el tamaño molecular estimado de la lipina-1 es de 98 kDa. La migración anómala de lipina-1 en electroforesis ha sido caracterizada anteriormente en otros tipos celulares y se piensa que se debe al gran número de residuos fosforilados que presenta esta proteína, incluso en condiciones de no estimulación celular (18). Para detectar la lipina-2 (100kDa) y lipina-3 (94kDa) se utilizaron anticuerpos comerciales. Ambas proteínas migran a la altura del marcador molecular de 100kDa (**Fig. 18A**).

Aunque el análisis de los niveles de ARNm para lipinas por PCR convencional en monocitos mostró expresión basal de la mayoría de los miembros de esta familia (**Fig. 16**), los niveles proteicos detectados por inmunoblot fueron relativamente bajos en esas células (**Fig. 18**). Durante el proceso de diferenciación de monocito a macrófago se produce un aumento en la expresión de lipina-1, -2 y -3 detectable a día 1, y que es máximo a día 2 (**Fig. 18A y B**). A partir de día 3 la expresión de todas ellas es estable hasta el final del proceso de diferenciación, excepto para la lipina-1, cuya expresión proteica disminuye a partir de día 6. Se analizó también la expresión del receptor de manosa (CD206) como marcador de diferenciación macrofágico, observándose aparición de la

proteína a partir del día 2 de diferenciación, manteniéndose estable hasta día 8, y bajando después sus niveles de forma muy acusada. Este comportamiento del CD206 no afecta a la funcionalidad de los macrófagos maduros. También se analizó la expresión de la ADRP, como marcador de gotas lipídicas, observándose un aumento paulatino de expresión proteico a partir de día 1, y alcanzando niveles muy elevados a partir de día 8 de diferenciación (**Fig. 18 A y B**). En paralelo se analizó el contenido celular de TAG, encontrándose una buena correlación con respecto a la expresión de ADRP. El contenido máximo de TAG se consigue el día 14 de diferenciación (**Fig. 18C**).

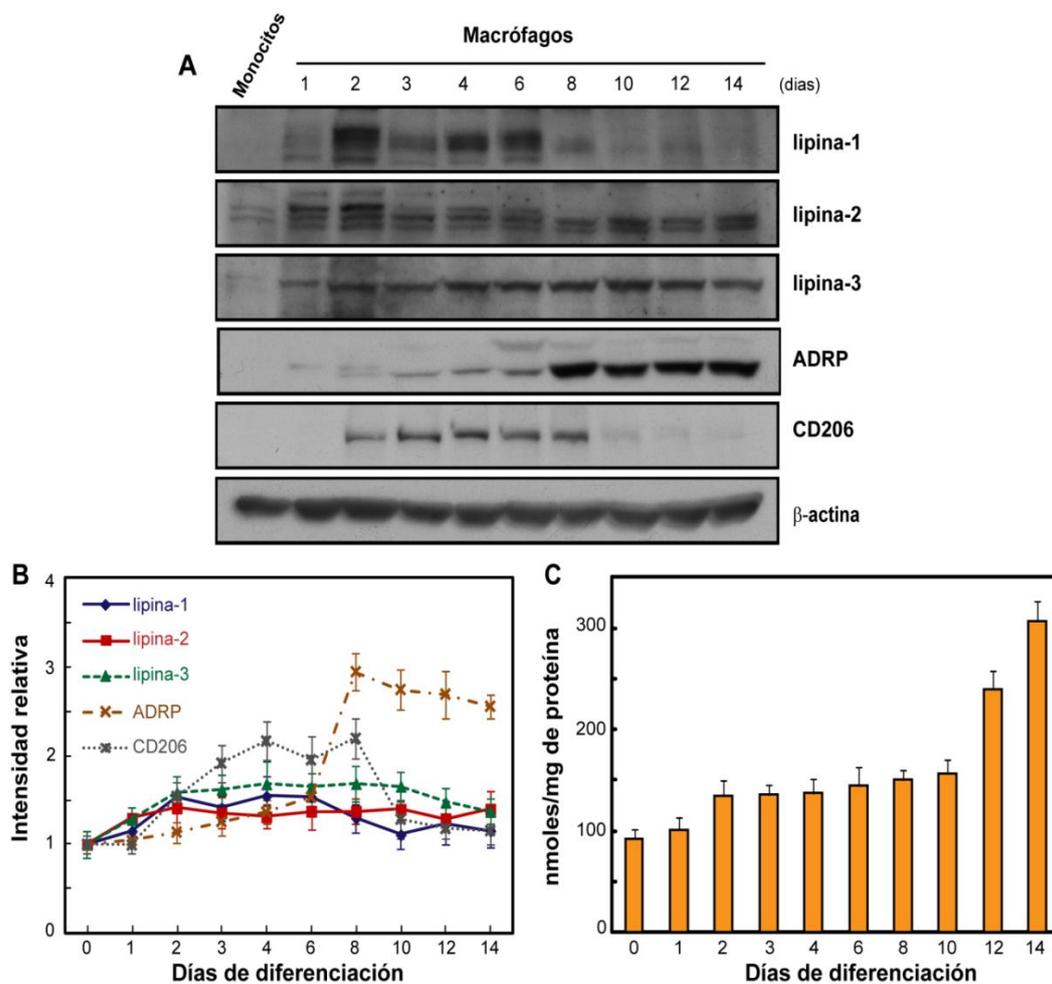


Figura 18. Expresión de diferentes proteínas durante el proceso de diferenciación de monocito a macrófago. A) Se realizaron lisados celulares de monocitos y macrófagos humanos diferenciados durante los días indicados, y se analizó por inmunoblot cada uno de los miembros de la familia lipina, la ADRP y el receptor de manosa (CD206), utilizando anticuerpos específicos. También se analizó la β -actina como control de carga. B) La intensidad de las bandas proteicas obtenidas se cuantificaron con respecto a la β -actina utilizando el *software* Quantity One (Bio Rad). C) Los lípidos celulares procedentes de macrófagos de diferentes días de diferenciación se separaron mediante TLC junto con cantidades conocidas de un estándar de TAG. A continuación los TAG se cuantificaron utilizando el *software* Quantity One (Bio Rad). La masa total de TAG se ha representado en con respecto a la concentración proteica de las muestras iniciales.

Debido a los cambios encontrados en expresión proteica durante el proceso de diferenciación, se quiso conocer si esos cambios correlacionaban con incrementos en los niveles de ARNm para las lipinas. Mediante qRT-PCR, se analizó la expresión del ARNm para lipinas durante las primeras horas de diferenciación macrofágica, observándose para todas ellas un aumento en la expresión a partir de las dos horas. El mayor aumento relativo se obtuvo para el ARNm de lipina-2 a las 6 horas de iniciarse el proceso, si bien todas ellas presentaron un patrón similar de expresión (**Fig. 19A**). Después de las 16 horas los niveles de ARNm disminuyeron, aunque la expresión se mantuvo por encima de la expresión en monocitos. Los niveles de ARNm del receptor de manosa aumentaron de forma considerable a partir de las 6 horas de diferenciación (**Fig. 19B**).

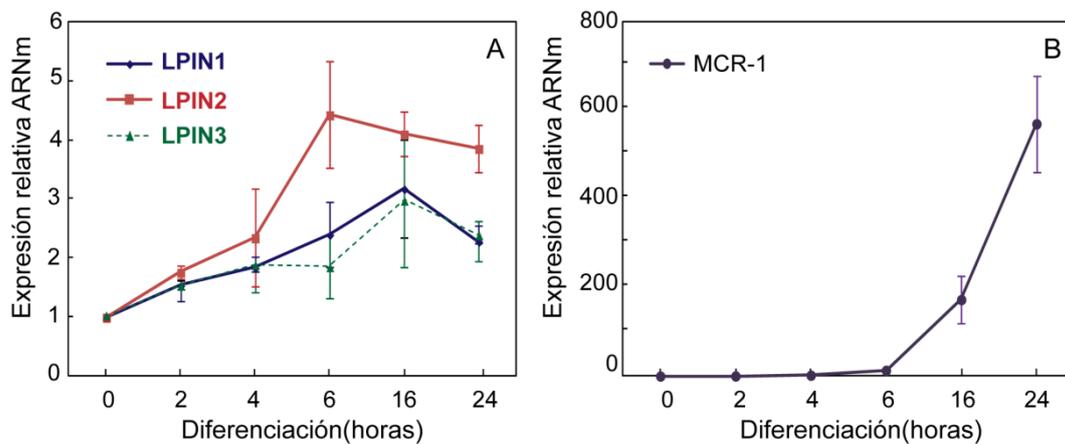


Figura 19. Expresión génica de la familia lipina durante las primeras horas de diferenciación macrofágica. El ARNm de monocitos y macrófagos diferenciados durante distintos periodos de tiempo se analizó por qRT-PCR. A) Expresión de ARNm para lipina-1, -2 y -3. B) Expresión de ARNm para MCR-1, que codifica para el receptor de manosa.

Además se realizó un análisis de los niveles de ARNm durante diferentes días de diferenciación a partir de día 2 (**Fig. 20**). Mientras que la lipina-1 mantuvo sus niveles estables a lo largo del proceso, la lipina-2 y 3 aumentaron su expresión a día 4, momento a partir del cual mantuvieron sus niveles estables. Este comportamiento es muy semejante al observado anteriormente con los niveles de proteína.

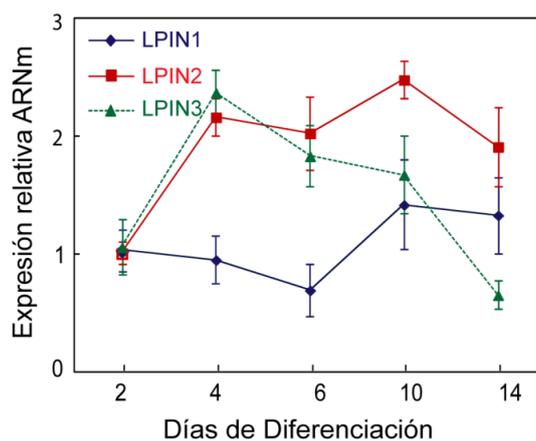


Figura 20. Análisis de la expresión génica de la lipinas a lo largo del proceso de diferenciación. El ARNm de macrófagos diferenciados durante distintos días se analizó por qRT-PCR para estudiar la expresión de ARNm para lipina-1, -2 y -3.

En conclusión, durante las primeras horas del proceso de maduración de monocito a macrófago, la expresión de todas las lipinas se incrementa muy significativamente. Esto podría indicar que la actividad PAP1 de las lipinas es necesaria durante la diferenciación, posiblemente para producir TAG a partir de los ácidos grasos del suero.

2. Localización subcelular de la lipina-1 en macrófagos humanos.

La localización subcelular de una proteína puede proporcionar información sobre la posible función que ésta ejerce en la célula de estudio. Por ello nos planteamos estudiar la localización subcelular de las lipina-1 en macrófagos utilizando como herramientas quimeras de estas proteínas con EGFPs, que se insertan en plásmidos de expresión y se introducen en los macrófagos mediante transfección por nucleofección. La localización subcelular de estas quimeras es analizada posteriormente por microscopía confocal.

La lipina-1 es el miembro más conocido y estudiado de esta familia de proteínas. La localización de las proteínas lipina-1 α y -1 β murinas han sido caracterizadas en distintos tipos celulares, pero no se conoce nada sobre su localización y función en células del sistema inmune(6, 28, 58, 59).

2.1. Lipina 1 α

Para el estudio de la localización de la lipina-1 α , se construyó el plásmido lipina-1 α -EGFP. El producto de esta construcción es una proteína de fusión, donde la proteína fluorescente se encuentra acoplada en el extremo C-terminal de la lipina-1 α humana.

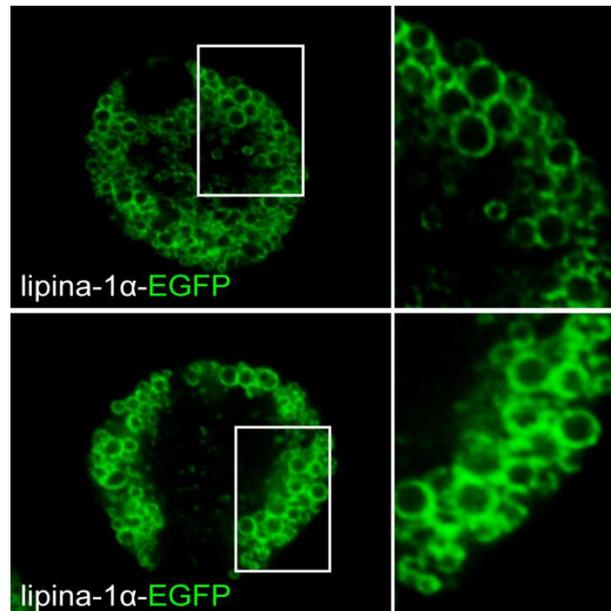


Figura 21. Localización subcelular lipina-1 α humana. Los macrófagos humanos fueron transfectados con 3 μ g del plásmido lipina-1 α -EGFP, se fijaron y posteriormente se analizaron por microscopía confocal. Las imágenes de la derecha son ampliaciones de la región recuadrada en cada una de las imágenes. Células representativas de un mínimo de 15.

Por microscopía confocal se observó que en macrófagos humanos la lipina-1 α se localizaba en unas estructuras redondeadas en el citoplasma de las células (**Fig. 21**). Esta localización no coincidía con los datos publicados hasta el momento sobre la localización de la lipina-1 α , por lo que se pensó en la posibilidad que la EGFP pudiera producir algún artefacto y, por tanto, esta localización no fuera real. Para descartar esta posibilidad se realizó otra construcción de la lipina-1 α con un epítipo de hemaglutinina (HA) ampliamente utilizado para inmunolocalizar proteínas y mucho menos voluminoso que la EGFP. El análisis de macrófagos humanos transfectados durante 24 horas con dicha construcción (HA-lipina-1 α), y teñidos por inmunocitoquímica con un anticuerpo frente a HA, mostró que la HA-lipina-1 α presentaba la misma localización subcelular que la construcción lipina-1 α -EGFP, alrededor de unas estructuras redondeadas en el interior celular (**Fig. 7**). También se realizaron otras construcciones cambiando la proteína

fluorescente al extremo N-terminal de la lipina-1 α y con proteínas fluorescentes distintas. Como puede verse en la **figura 22**, las construcciones ECFP-lipina-1 α y lipina-1 α -Orange seguían manteniendo la misma localización subcelular, por lo que se descartó la posibilidad que la localización de la lipina-1 α observada fuera un artefacto de nuestras construcciones.

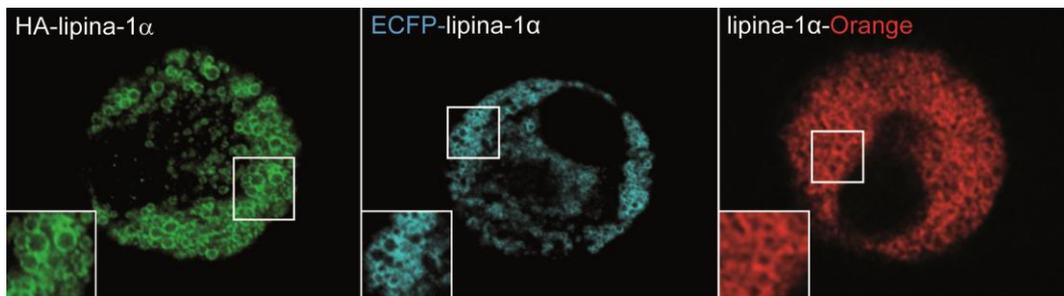


Figura 22. Localización subcelular de la HA-lipina-1 α , ECFP-lipina-1 α y lipina-1 α -Orange. Los macrófagos humanos transfectados con los plásmidos HA-lipina1 α , ECFP-Lipin1 α y Lipin1 α -Orange fueron analizados por microscopía confocal. Para visualizar la HA-lipina-1 α se realizó previamente inmunohistoquímica con anticuerpos específicos contra la HA tal y como se explica en Materiales y Métodos. El recuadro es una ampliación de una parte de la imagen. Células representativas de un mínimo de 15 para cada condición.

El siguiente paso fue identificar las estructuras alrededor de las cuales se localiza la lipina-1 α . Para abordar este estudio se utilizó en primer lugar Rojo Nilo, que es un marcador de lípidos neutros, componente mayoritario de las gotas lipídicas. Como muestra la **figura 23**, el Rojo Nilo tiñe el interior de las estructuras alrededor de las cuales se localiza la lipina-1 α -EGFP en los macrófagos, indicando que estas estructuras son muy posiblemente gotas lipídicas. El estudio tridimensional de las células corroboró que la lipina-1 α se encuentra alrededor de dichos orgánulos (**Fig. 23B**).

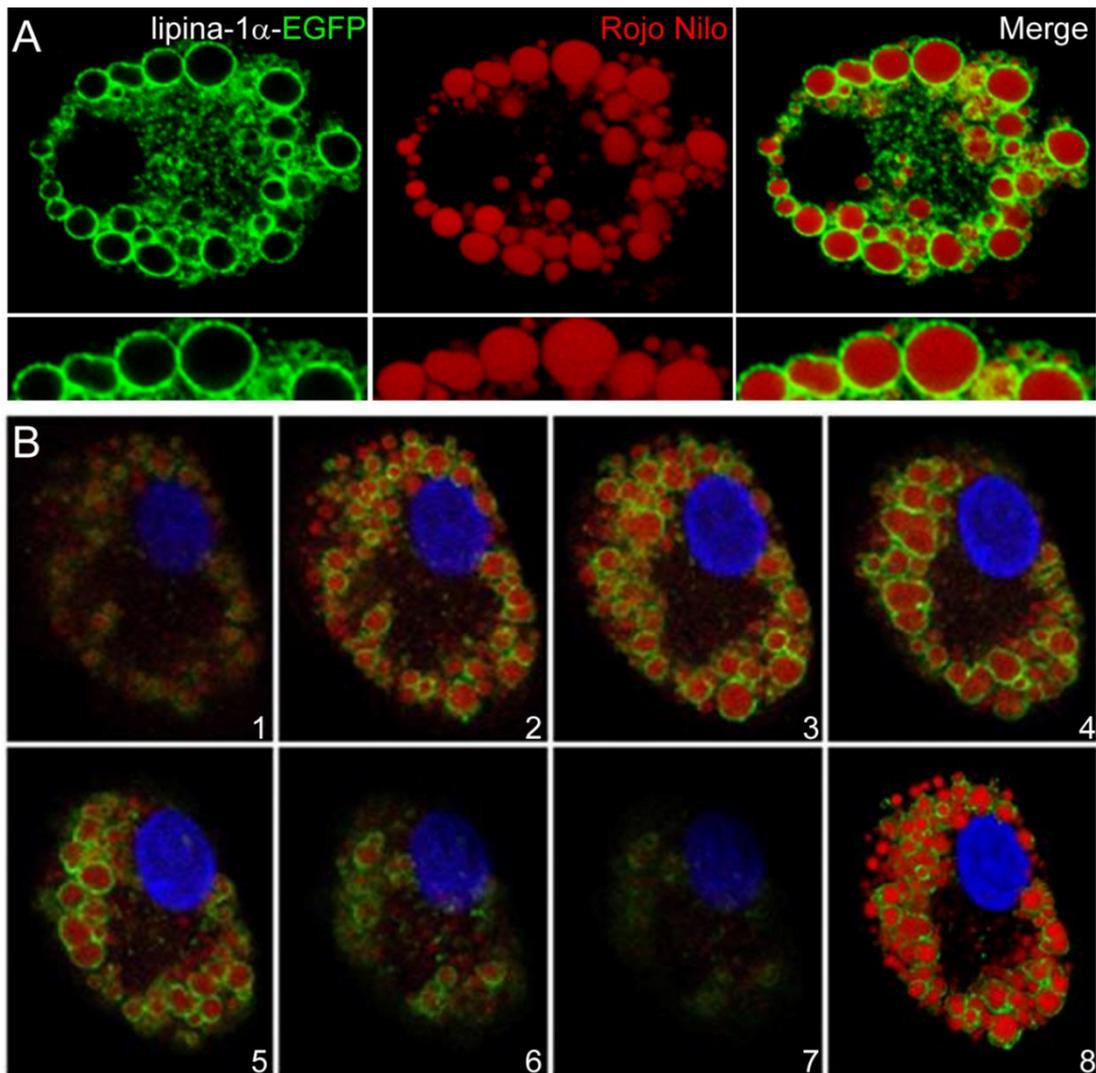


Figura 23. La lipina-1 α en macrófagos humanos se encuentra asociada a gotas lipídicas. A,B) Los macrófagos humanos fueron transfectados con lipina-1 α -EGFP (verde), teñidos con 100ng/ml de Rojo Nilo, y analizados por microscopía confocal. B) Cortes en Z de un macrófago y reconstrucción tridimensional (imagen 8) con el software ZEN 2009 de Zeiss. El núcleo está teñido con DAPI. Células representativas de un mínimo de 15.

Para asegurarnos de que el Rojo Nilo estaba tiñendo en los macrófagos las gotas lipídicas, utilizamos otro marcador de lípidos neutro como el BODIPY 493/503 y además localizamos por inmunohistoquímica un marcador proteico de la membrana de estos orgánulos como es la ADRP. En la **figura 24**, se muestra que el Rojo Nilo y el BODIPY 493/503 tiñen estructuras similares en los macrófagos, y que estas estructuras están rodeadas de unas membranas enriquecidas en ADRP, confirmando que se trata de gotas lipídicas.

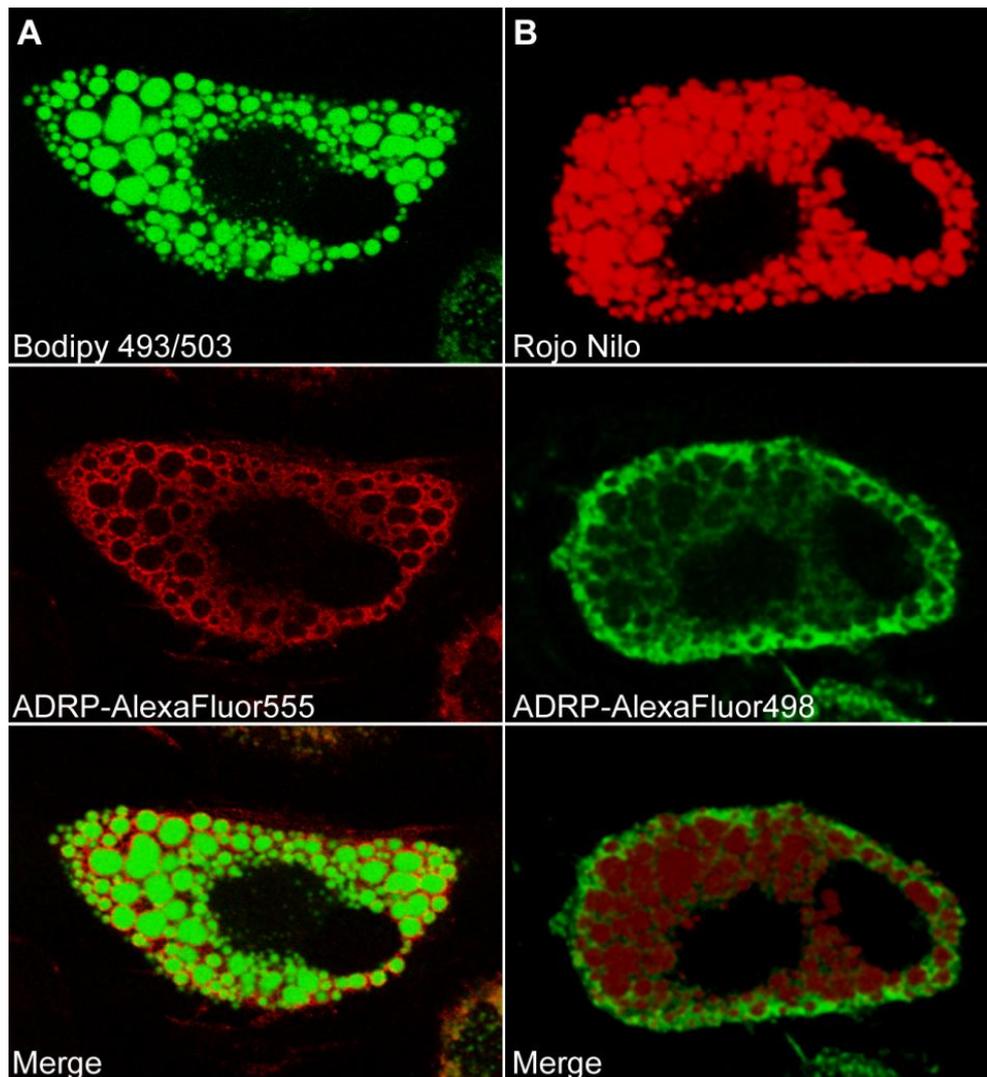


Figura 24. Marcadores de gotas lipídicas. Los macrófagos humanos fueron inmunocitoquímicamente teñidos con anticuerpos específicos para ADRP, usando IgG-Alexa-Fluor488 (verde) o IgG-Alexa-Fluor 555(rojo) como anticuerpos secundarios como se indica. A continuación, se marcaron con BODIPY 493/503(verde, A) o con Rojo Nilo (rojo, B). Se tomaron imágenes de microscopía confocal mostrándose los canales de fluorescencia verde, roja y la superposición de ambas (merge). El BODIPY 493/503 y el Rojo Nilo marcan los lípidos neutros, mientras que la ADRP la membrana de las gotas lipídicas. Células representativas de un mínimo de 15.

Para corroborar la localización de la lipina-1 α en la membrana de las gotas lipídicas, también se realizaron tinciones inmunocitoquímicas con anticuerpos específicos para ADRP en macrófagos transfectados con lipina-1 α -EGFP y posteriormente, análisis de colocalización con el *software* Image J 1.44. En la **figura 25** se muestran las fluorescencias de la lipina-1 α -EGFP (verde) y la ADRP (roja) y la superposición de ambas fluorescencias (merge), así como la máscara de colocalización (blanco) que corresponde a aquellos píxeles de la imagen que contienen tanto fluorescencia rojo como verde. El análisis de

colocalización proporciona además un índice que nos da información sobre el grado de colocalización de ambas proteínas. Este índice está comprendido entre los valores -1 y 1, y la cercanía al valor 1 da idea de un mayor grado de colocalización, y una mayor seguridad de que dicha asociación existe. El índice de colocalización entre la lipina-1 α y la ADRP, dio un valor de $0,58\pm 0,023$, confirmando dicha colocalización y la localización de la lipina-1 α en gotas lipídicas en macrófagos humanos.

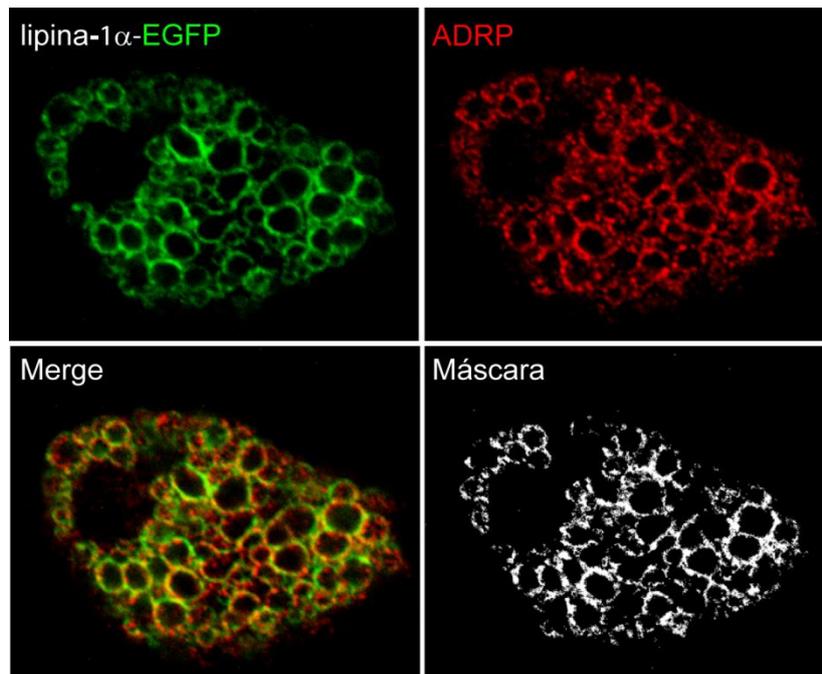


Figura 25. Colocalización de la lipina-1 α con ADRP en macrófagos. Los macrófagos humanos fueron transfectados con lipina-1 α -EGF, teñidos por inmunocitoquímica usando un anticuerpo específico frente a ADRP y analizados por microscopía confocal. La máscara de colocalización se obtuvo usando el software ImageJ 1.44. Célula representativa de un mínimo de 15.

Se realizaron también estudios de colocalización con TIP47 (otro marcador proteico de las membranas de las gotas lipídicas que se une principalmente en condiciones de activación celular o cuando éstas se tratan con ácidos grasos como el ácido oleico). Para ello las células se estimularon previamente con $200\mu\text{M}$ de ácido oleico y a continuación, se realizó una inmunocitoquímica y se tomaron imágenes por microscopía confocal (**Fig. 26**). Los resultados mostraron que la lipina-1 α -EGFP también colocaliza con TIP47, siendo el índice de colocalización de $0,41\pm 0,021$.

Nuestro estudio describe por tanto una nueva localización para la lipina-1 α , una proteína que originalmente se postulaba como exclusivamente nuclear(3). La localización

de la lipina-1 α en gotas lipídicas, aporta nuevas expectativas sobre la posible función de la lipina-1 α en células del sistema inmune innato.

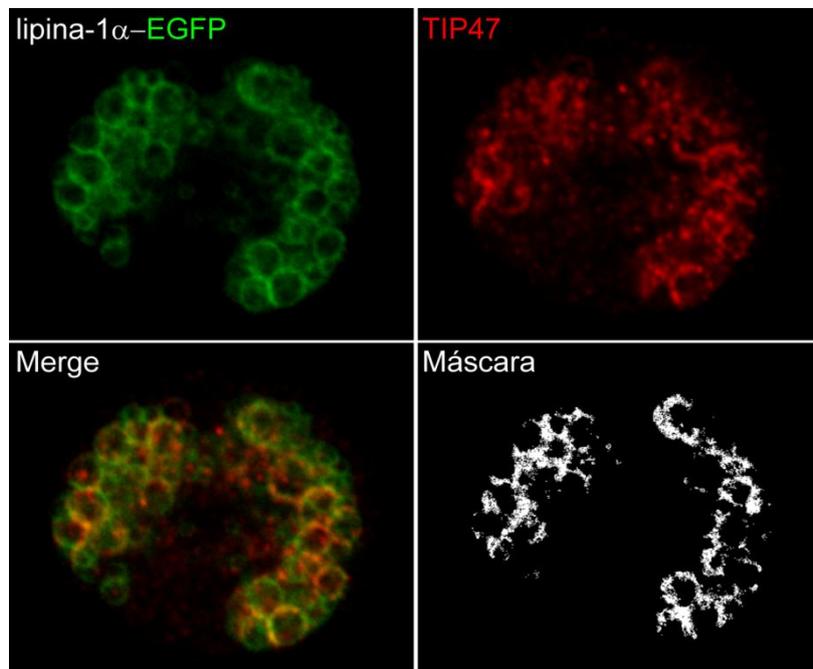


Figura 26. Colocalización de la lipina-1 α con TIP47. Los macrófagos humanos transfectados con lipina-1 α -EGFP, fueron tratados con 200 μ M de ácido oleico durante 18h y teñidos por inmunocitoquímica usando un anticuerpo específico frente a TIP47. Las imágenes están realizadas por microscopía confocal. La máscara de colocalización se obtuvo usando el software ImageJ 1.44. Célula representativa de un mínimo de 15.

2.1.1 La Localización de la lipina-1 α no cambia en macrófagos activados.

La lipina-1 α en macrófagos humanos se asocia a gotas lipídicas, para comprobar si esta localización puede cambiar, se llevaron a cabo varios estudios.

En primer lugar se comprobó si la actividad PAP1 de la lipina-1 α puede influir en su localización. Para ello mediante mutagénesis dirigida se construyó el plásmido lipina-1 α -D678E-EGFP, que presenta una mutación puntual en el motivo catalítico que anula completamente su actividad. Por microscopía confocal se observó que dicho plásmido presenta el mismo patrón de localización que la “proteína silvestre” (**Fig. 27A**). Por tanto, la actividad enzimática de la lipina-1 α no parece influir en su localización subcelular.

En segundo lugar, y puesto que la lipina tiene un motivo de localización nuclear, se quiso comprobar si la lipina-1 α puede localizarse en el núcleo en ciertas condiciones, como se ha demostrado en otros tipos celulares(28, 58). Para ello se realizaron experimentos con Leptomicina B. Este compuesto, es un potente inhibidor del exporte nuclear(164), por lo que inhibiría la translocación de la lipina del núcleo al citoplasma, si esto ocurre en algún momento. Como muestra la **figura 27** el tratamiento con Leptomicina B no altera la localización de la lipina-1 α en macrófagos humanos implicando que esta proteína no tiene localización nuclear en estas células.

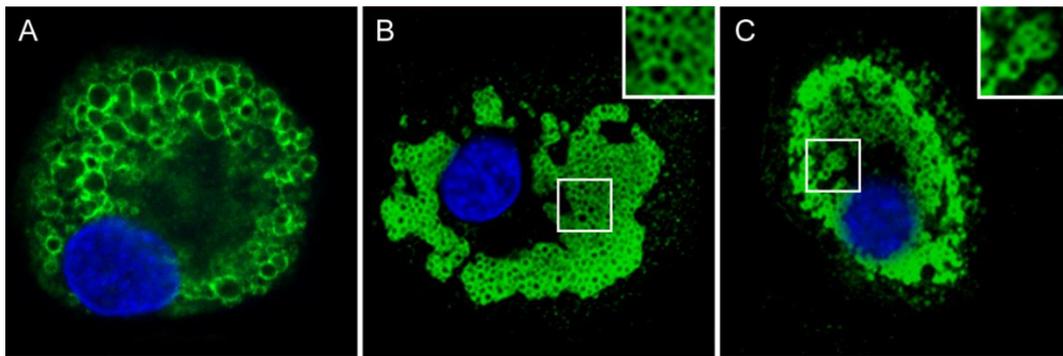


Figura 27. La localización de la lipina-1 α no cambia en macrófagos activados. Los macrófagos humanos fueron transfectados con lipina-1 α -EGFP(A), lipina-1 α -D678E-EGFP(A) y con lipina-1 α -EGFP tratadas con 10ng/ml de Leptomicina B durante 24h (B). Se tomaron imágenes por microscopía confocal. Los recuadros son ampliaciones de áreas seleccionadas. Células representativas de un mínimo de 15.

En tercer lugar, se ha descrito que el tratamiento con ácido oleico o insulina provoca un cambio en la localización de la lipina-1 β en células murinas (18). Para determinar si la lipina-1 α puede cambiar su localización en macrófagos humanos dependiendo de su estado de activación, las células se trataron con ionomicina, PMA (potentes activadores de los macrófagos) (165)), LPS, como activador de la respuesta inmune, y ácido oleico como inductor de formación de gotas lipídicas. La **figura 28** muestra que ninguno de los estímulos utilizados fue capaz de cambiar la localización de la lipina-1 α . Por tanto, en macrófagos humanos la localización subcelular de la lipina-1 α no parece depender del estado de activación de la célula.

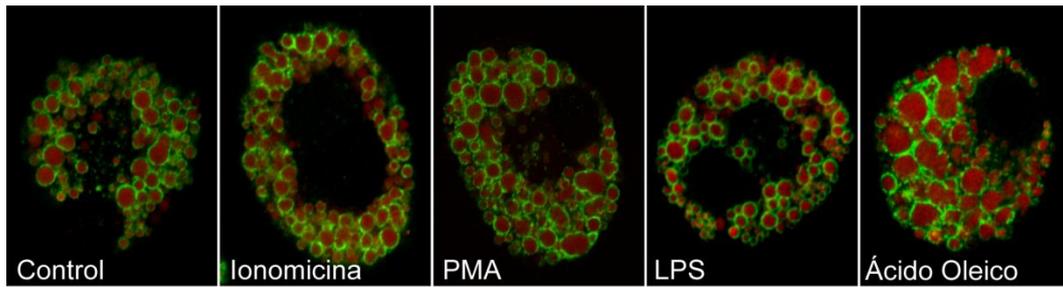


Figura 28. La localización de la lipina-1 α no cambia tras la estimulación. Los macrófagos humanos fueron transfectados con lipina-1 α -EGFP, se estimularon con 1 μ M de Ionomicina, 80nM de PMA, 100ng/ml de LPS o 200 μ M de ácido oleico durante una hora y a continuación se tiñeron con Rojo Nilo (100ng/ml) y se tomaron por microscopía confocal. Células representativas de un mínimo de 15.

2.1.2 Orientación de la lipina-1 α en gotas lipídicas

Posteriormente nos propusimos estudiar cual era la orientación de la lipina-1 α en la membrana de las gotas lipídicas: si estaba en la cara citosólica o en la cara interna, en contacto con los lípidos neutros. Para ello se realizó un ensayo denominado “Ensayo de protección de la fluorescencia frente a proteasas” (153). Esta técnica se basa en la toma de imágenes secuenciales de fluorescencia por microscopía confocal en célula viva, y permite evaluar la topología de una proteína unida a membranas celulares tal y como se indica en materiales y métodos. Se realiza generalmente en células que expresan la proteína de interés fusionadas a una proteína fluorescente, y se observa si la fluorescencia se pierde o no, una vez que las células son permeabilizadas con digitonina y tratadas con una proteasa. En el caso de que la fluorescencia no desaparezca se deduce que, al menos la proteína fluorescente está en el interior del orgánulo que se observe, protegida de la acción de las proteasas por las membranas de ese orgánulo. Para realizar este estudio es importante conocer la posición de la proteína fluorescente en la proteína de fusión. En el caso de la lipina-1 α , la EGFP se une al extremo C- terminal de la proteína de fusión lipina-1 α -EGFP. Como muestra la **figura 29**, una vez que los macrófagos transfectados fueron tratados con tripsina, la fluorescencia observada desapareció completamente en dos segundos, indicando que la lipina-1 α se localiza en la cara citosólica de la gota lipídica y no en el lumen de dicho orgánulo. En el experimento mostrado el tratamiento con digitonina provocó una importante disminución de la fluorescencia inicial celular. Es posible la fluorescencia restante sea la debida a la proteína que está fuertemente unida a las membranas de las gotas lipídicas.

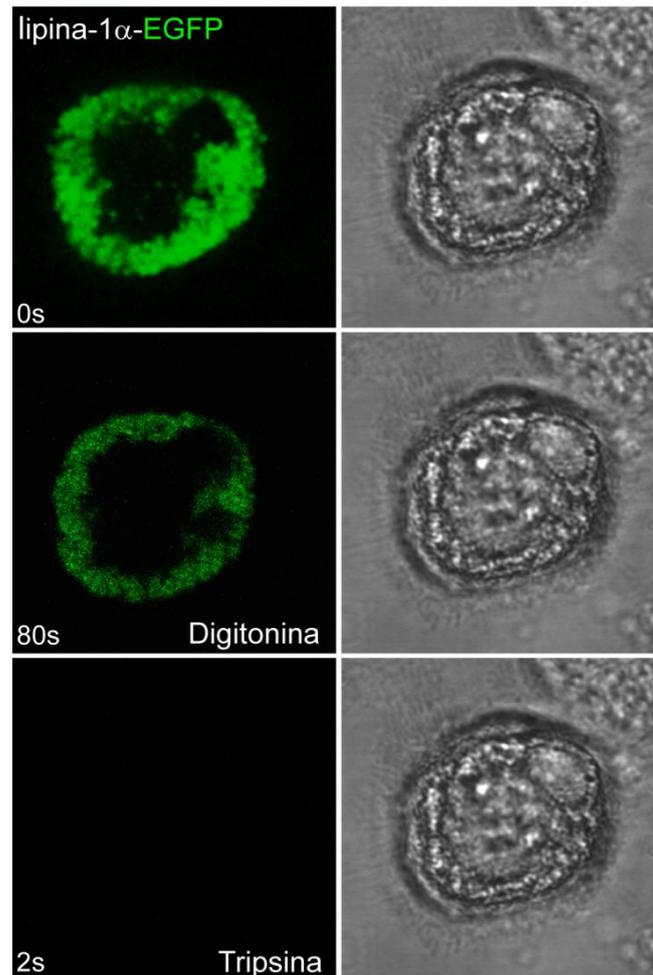


Figura 29. La lipina-1 α se asocia con la cara citosólica de la membrana de las gotas lipídicas. Los macrófagos humanos fueron transfectados con lipina-1 α -EGFP, plaqueadas en placas de fondo de vidrio MatTek, y se analizaron por microscopía confocal *in vivo*. Las imágenes se tomaron antes (0s) y después de la permeabilización con 20 μ M de digitonina (80 s), y tras el tratamiento con 4 μ M de tripsina (2s). Las imágenes de la columna izquierda muestran la fluorescencia debida a lipina-1 α -EGFP, mientras que las imágenes de la derecha muestran imágenes de transmisión. Célula representativa de un mínimo de 5.

2.2 Lipina 1 β

La lipina-1 β contiene una secuencia de 33 aa adicionales que no tiene la lipina-1 α (6), esta inserción no se localiza en las zonas altamente conservadas de la proteína, por lo que teóricamente ambas isoformas pueden presentar la misma localización. Sin embargo, se ha demostrado que la lipina-1 α y lipina-1 β murinas poseen diferentes patrones de localización subcelular (6, 11). Para estudiar la localización de la lipina-1 β humana en macrófagos se construyó un plásmido que contenía su secuencia unida a la EGFP (lipina-1 β -EGFP). Como se muestra en la **figura 30**, su expresión en macrófagos

humanos, no da lugar a una proteína asociada a gotas lipídicas, como era el caso de la lipina-1 α , sino que presenta una localización citosólica, sin que parezca estar unida a ningún orgánulo ni membrana intracelulares. Por tanto, en macrófago humanos la lipina-1 α y la lipina-1 β muestran un patrón de localización diferente, sugiriendo que cada una debe desempeñar funciones distintas.

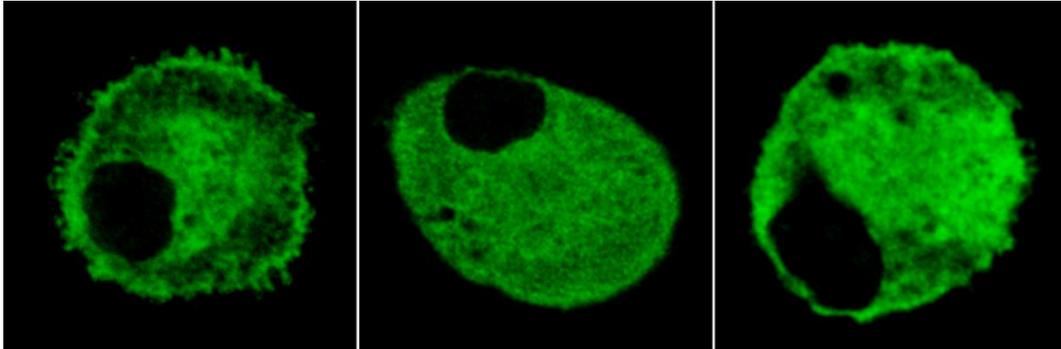


Figura30. Localización subcelular de la lipina-1 β humana. Los macrófagos humanos fueron transfectados con el plásmido lipina-1 β -EGFP y posteriormente se analizaron por microscopía confocal. La imagen muestra tres células distintas cogidas al azar. Células representativas de un mínimo de 15.

La lipina-1 β humana presentaba una localización citosólica en la gran mayoría de las células, sin embargo, un porcentaje pequeño de la población (<20%) también mostraba fluorescencia dentro del núcleo (**Fig. 31**), característica que nunca se observó con la lipina-1 α . Esta localización heterogénea de la lipina-1 β entre núcleo y citosol, también se ha descrito para células HEK293 transfectadas con un plásmido que expresaba la lipina-1 β murina unida a EGFP (9).

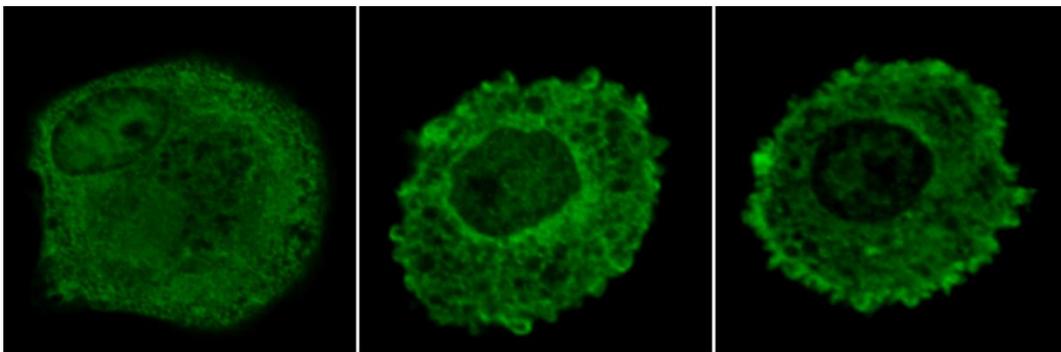


Figura 31. Localización nuclear de la lipina-1 β . Los macrófagos humanos fueron transfectados con el plásmido lipina-1 β -EGFP y posteriormente se analizaron por microscopía confocal. La imagen muestra tres células escogidas con fluorescencia tanto en el citosol como en el núcleo. Células representativas de un mínimo de 15.

Para corroborar que la lipina-1 β no se encuentra asociada a gotas lipídicas se llevaron a cabo experimentos utilizando Rojo Nilo para visualizar estos orgánulos y anticuerpos específicos contra ADRP en macrófagos humanos que sobreexpresaban la lipina-1 β -EGFP. Como se muestra en la **figura 32**, la lipina-1 β no colocaliza con las estructuras teñidas con Rojo Nilo o con la ADRP, implicando que la lipina-1 β no se asocia con gotas lipídicas. Además, realizando un análisis de colocalización entre la lipina-1 β y la ADRP como el realizado anteriormente para la lipina-1 α , no se generó una máscara de colocalización y el índice de colocalización obtenido fue negativo ($-0,36\pm 0,08$), confirmando que la lipina-1 β no se une a gotas lipídicas.

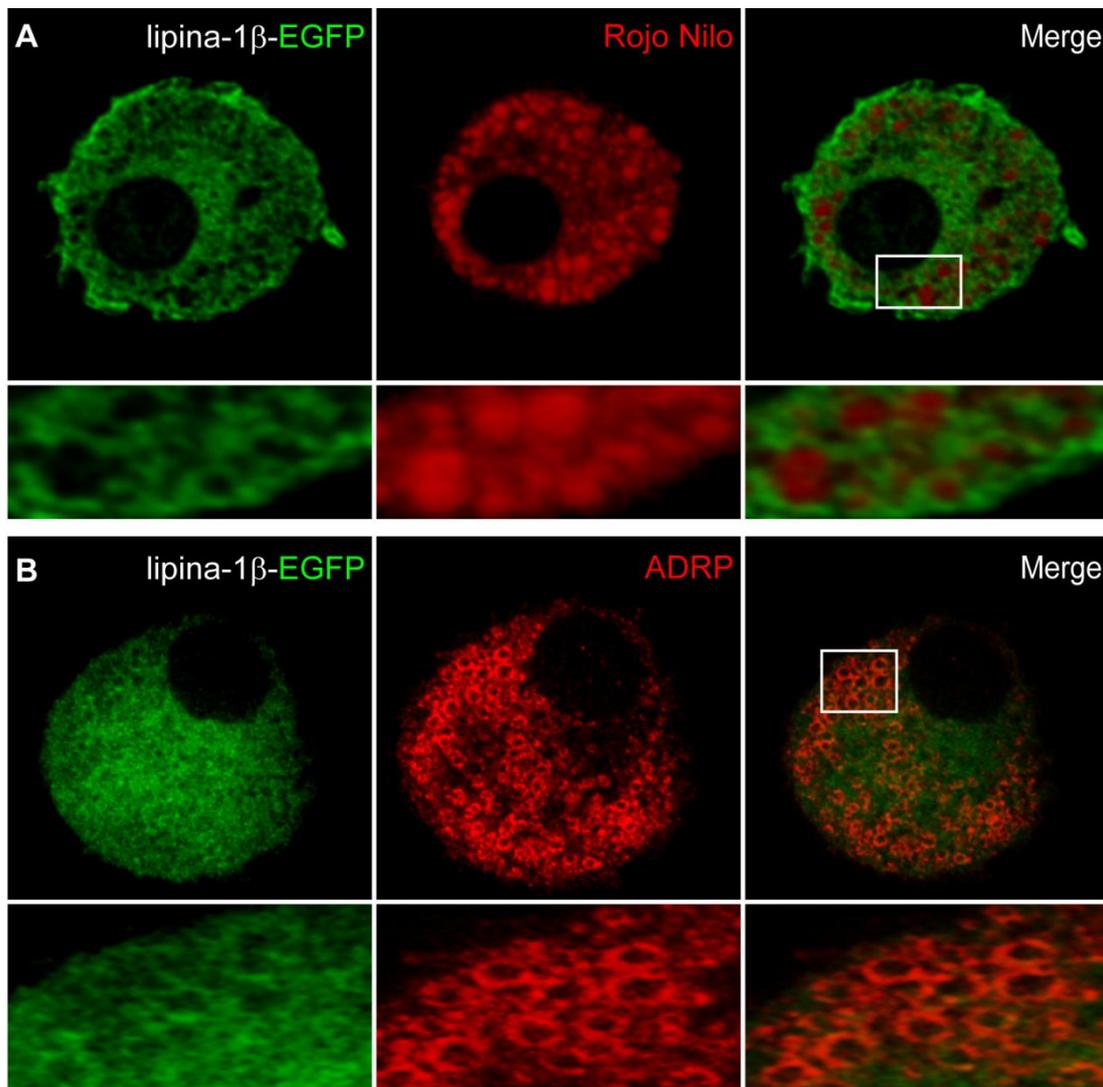


Figura 32. La lipina-1 β no se asocia con gotas lipídicas. Los macrófagos humanos se transfectaron con lipina-1 β -EGFP (fluorescencia verde) y se tiñeron con 100ng/ml de Rojo Nilo (fluorescencia roja, A), o marcados por inmunocitoquímica usando un anticuerpo específico frente a ADRP (fluorescencia roja, B) y analizados por microscopía confocal. Las imágenes inferiores corresponden a ampliaciones de las áreas seleccionadas. Células representativas de un mínimo de 15

Se ha descrito que la lipina-1 β colocaliza parcialmente con el RE (9), por tanto se decidió estudiar si en macrófagos humanos ocurre lo mismo. Para ello se utilizó un marcador de RE (ER-Tracker-Red). Como muestra la **figura 33** las fluorescencias provenientes de la lipina-1 β -EGFP y del ER-Tracker-ER no se superponen en ningún punto, indicando que esta proteína no se localiza en el RE. Además, el análisis de colocalización no generó máscara de colocalización y el índice de colocalización dio negativo (-0,28 \pm 0,04). Con todos estos datos podemos concluir que la lipina-1 β en macrófagos humanos se localiza en el citosol y en un porcentaje pequeño de células puede además encontrarse en el núcleo.

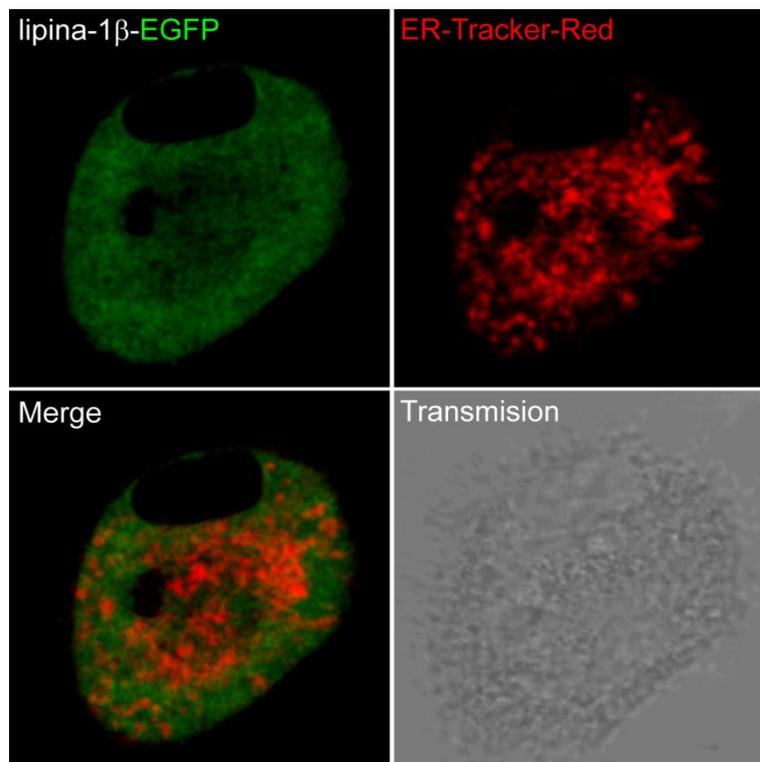


Figura 33. La lipina-1 β no se localiza el RE Los macrófagos humanos fueron transfectados con lipina-1 β -EGFP, teñidos con 500nM de ER-Tracker-Red y se analizaron por microscopía confocal. Células representativas de un mínimo de 15

2.3 Efectos de la coexpresión de lipina-1 α y lipina-1 β en macrófagos

Como hemos demostrado, en macrófagos humanos, la lipina-1 α y la lipina-1 β , presentan localizaciones diferentes. Los estudios de localización de estas proteínas se habían llevado a cabo transfectando los plásmidos que expresan estas proteínas de forma independiente. A continuación se planteó si la localización de estas proteínas podía modificarse cuando se sobreexpresan juntas. Para ello, se utilizaron plásmidos con

construcciones de cada lipina-1 con diferentes proteínas fluorescentes para poderlas diferenciar por microscopía confocal.

Por nuestra experiencia, los macrófagos humanos se pueden transfectar con dos plásmidos a la vez, sin que ello afecte a la viabilidad celular. Se transfectaron conjuntamente, la lipina-1 α -EGFP y la lipina-1 β -Orange, o la lipina-1 α -Orange y la lipina-1 β -EGFP. Como se muestra en la **figura 34** cuando se transfecta conjuntamente ambas isoformas, la lipina-1 α se mantiene en gotas lipídicas y la lipina-1 β se localiza en citosol y núcleo en una gran parte de las células (85%). Por tanto, la localización de la lipina-1 β parece modificarse al sobreexpresar la lipina-1 α , mientras que la localización de la lipina-1 α no se ve afectada cuando la lipina-1 β es sobreexpresada.

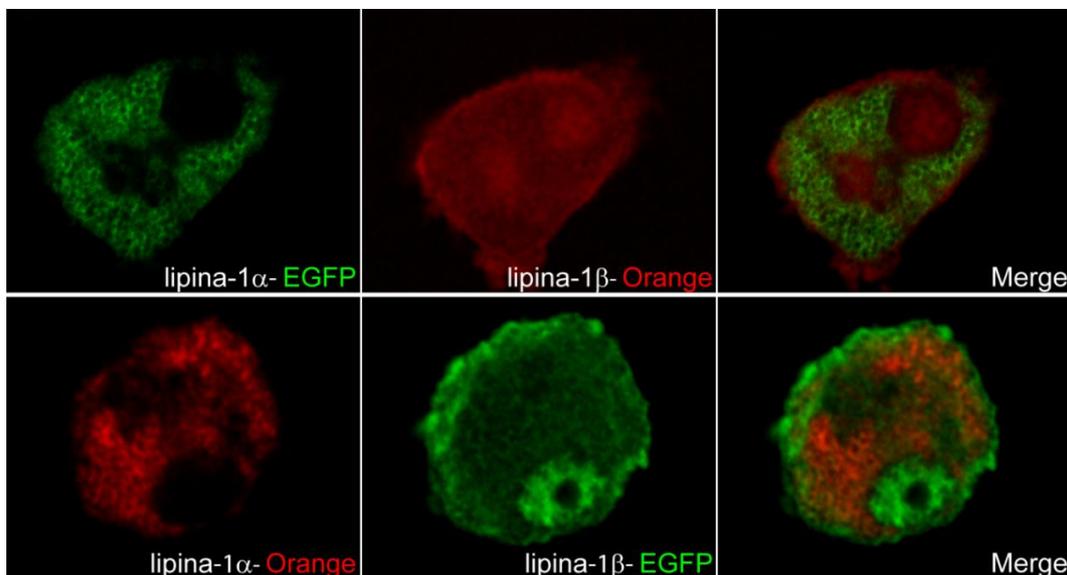


Figura 34. Localización de la lipina-1 α y lipina-1 β cuando se sobreexpresan conjuntamente. Los macrófagos humanos fueron transfectados con los plásmidos lipina-1 α -EGFP y lipina-1 β -Orange, o lipina-1 α -Orange y lipina-1 β -EGFP y se analizaron por microscopía confocal. A la derecha se muestra la superposición de los canales verde y rojo (Merge). Células representativas de un mínimo de 15

2.4 Localización subcelular de la lipina-1 endógena en macrófagos humanos

Los estudios utilizando plásmidos de expresión han demostrado que la lipina-1 α se encuentra en gotas lipídicas, mientras que la lipina-1 β presenta una localización citosólica en macrófagos humanos. A continuación nos planteamos estudiar si la localización de la lipina-1 endógena era la misma que la de las quimeras sobreexpresadas. Para ello se

intentó realizar tinciones por inmucitoquímica utilizando un anticuerpo específico generado en el laboratorio. Sin embargo, los resultados obtenidos no fueron satisfactorios. Como se puede observar en la **figura 35**, este anticuerpo no sólo reconoce la banda proteica de la lipina-1 (130 kDa) en inmunoblot, sino que también detecta otras bandas proteicas. Dependiendo del tipo celular, la lipina-1 es la banda mayoritaria en este tipo de análisis, o no, tal y como pasa en células HEK 293. El anticuerpo, sin embargo es capaz de reconocer la quimera de lipina-1-EGFP transfectada en células HEK 293 (160 kDa), tal y como se esperaba de un anticuerpo específico (**Fig. 35**). El hecho de que por inmunoblot este anticuerpo reconozca varias proteínas es una de las razones por las cuales el anticuerpo no es recomendable para hacer tinciones por inmunohistoquímica.

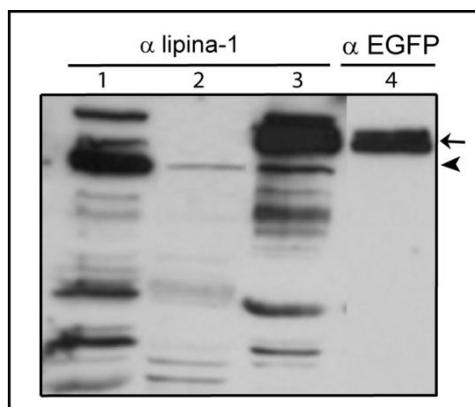


Figura 35. Análisis por inmunoblot de la lipina-1. Homogenizados de células U937 (línea 1), y HEK 293 sin transfectar (línea 2) o transfectadas (líneas 3 y 4) con lipina-1 α -EGFP se analizaron por inmunoblot utilizando un anticuerpo específico para lipina-1 (líneas 1-3) o un anticuerpo específico frente a GFP (línea 4). La punta de flecha indica la lipina-1 endógena (130 kDa), mientras que la flecha indica el tamaño de la proteína de fusión lipina-1 α -EGFP (160 kDa). Experimento representativo de 3 con resultados similares.

Se planteó entonces el estudio de la localización de la lipina-1 endógena en macrófagos humanos, mediante fraccionamiento subcelular y análisis por inmunoblot. A partir de homogenizados de macrófagos humanos, se obtuvieron tres fracciones por ultracentrifugación a 50.000 x g. La primera fracción (“flotante”) correspondía a las gotas lipídicas, la segunda a la fracción acuosa es la citosólica y la tercera fracción sedimentada correspondía a la fracción de membranas. Cada una de las fracciones obtenidas junto con una muestra de homogenizado total se analizó por inmunoblot utilizando el anticuerpo específico para lipina-1 y un anticuerpo específico para ADRP (**Fig. 36**). Los resultados mostraron que la ADRP, solo aparece en la fracción correspondiente a las gotas lipídicas, sin embargo, la lipina-1 se encontró tanto en esta fracción como en la fracción citosólica y

en el homogenizado total, pero no se detecta en la fracción correspondiente a membranas. La ADRP por su parte sólo aparecía en la fracción de gotas lipídicas y en el homogenizado total, indicando que la separación de las gotas lipídicas era correcta.

El peso molecular de la banda reconocida por el anticuerpo frente a lipina-1 en la fracción citosólica es ligeramente superior que el encontrado en la fracción de gotas lipídicas (**Fig. 36**). Puesto que el péptido utilizado para generar el anticuerpo frente a lipina-1 se encuentra presente en la secuencia de las dos isoformas de la lipina-1 (α y β), y puesto que el peso molecular de la lipina-1 β es ligeramente superior (3,6 kDa) al de la lipina-1 α , los resultados obtenidos estarían de acuerdo con los datos de microscopía, y demostrarían que la lipina-1 α endógena se encuentra asociada a gotas lipídicas, mientras que la isoforma lipina-1 β endógena estaría mayormente en el citosol celular.

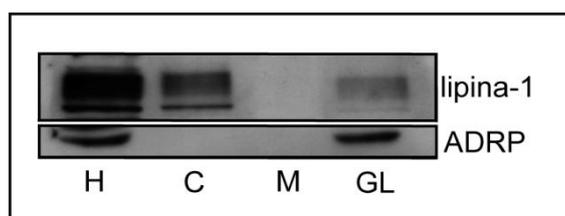


Figura 36. Análisis de la localización endógena de la lipina-1 en macrófagos humanos. Los macrófagos humanos se lisaron, y los lisados se sometieron a ultracentrifugación. Se analizaron por inmunoblot cantidades equivalentes de homogenizado total (H), de la fracción citosólica (C), de la fracción de membranas (M) y de la fracción de gotas lipídicas (GL), utilizando anticuerpos específicos frente a lipina-1 y ADRP. Experimento representativo de 3 con resultados similares.

3. Función de la lipina-1 en la síntesis lipídica

3.1 Papel de la lipina-1 en la síntesis de TAG en macrófagos humanos

La lipina-1 α se encuentra asociada a las gotas lipídicas, el principal almacén de TAG celular. Puesto que las lipinas catalizan la desfosforilación del PA para producir DAG, principal precursor de la biosíntesis de TAG (166, 167)(167), se planteó estudiar si la lipina-1 tiene un papel en la síntesis de TAG en macrófagos.

Para abordar este estudio, se utilizó siRNA, una herramienta fundamental para silenciar selectivamente genes de interés. A través de este mecanismo, se puede producir una bajada drástica en la expresión del gen diana, y estudiar los efectos de esta disminución. Incorporando el siRNA específico contra lipina-1 en los macrófagos humanos mediante nucleofección a una concentración de 20nM se consiguió, tras 48h, una reducción del 70-90% en la expresión de la lipina-1 (**Fig. 37**). El siRNA utilizado para disminuir la expresión de la lipina-1, reduce la expresión de las dos isoformas, α y β , por lo que los resultados se deben a la falta de las dos proteínas.

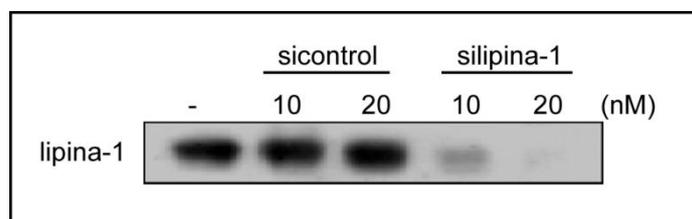


Figura 37. Silenciamiento génico de la lipina-1 por metodología del siRNA. Los macrófagos humanos se nucleofectaron con las concentraciones indicadas de siRNA control (sicontrol), o siRNA contra lipina-1 (silipina-1). Tras 48 h se realizaron homogeneizados y se analizaron por inmunoblot utilizando un anticuerpo específico contra lipina-1.

Para analizar la implicación de la lipina-1 en la síntesis de TAG, los macrófagos humanos tratados con siRNA contra lipina-1, se expusieron a concentraciones bajas de [14 C] ácido oleico ($1\mu\text{M}$), con el fin de no perturbar el metabolismo lipídico celular, evitar posibles lipotoxicidades, y analizar su incorporación a TAG. La **figura 38** muestra que no existen diferencias significativas en la de incorporación de [14 C] ácido oleico a TAG en las células carentes de lipina-1 con respecto a las controles, indicando que esta proteína no está implicada en la síntesis de *nov* de TAG en macrófagos humanos.

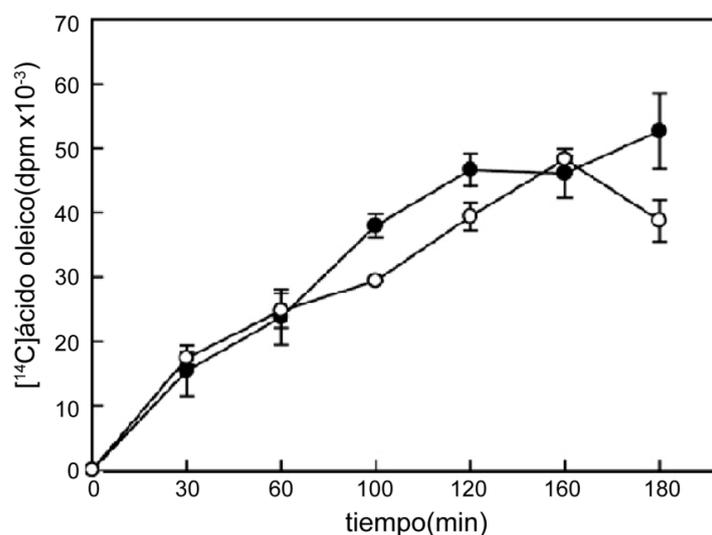


Figura 38. Incorporación de $[^{14}\text{C}]$ ácido oleico en TAG. Los macrófagos humanos fueron tratados con siRNA control (20nM, círculos negros) o siRNA frente a lipina-1 (20nM, círculos blancos). Tras 48h, las células se trataron con $[^{14}\text{C}]$ ácido oleico durante los tiempos indicados y se midió la radiactividad incorporada en TAG según lo indicado en materiales y métodos. La gráfica se representa como la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por duplicado.

Para corroborar este hallazgo tan inesperado se realizó el mismo experimento en macrófagos peritoneales procedentes de ratones *fld* (carentes de lipina-1) y de ratones heterocigotos para la mutación *fld*, como control. Los macrófagos peritoneales de ratones *fld* no sólo no mostraron una disminución en la incorporación de $[^{14}\text{C}]$ ácido oleico en TAG, sino que la incorporación fue ligeramente mayor que en las células control (**Fig. 39**). Por tanto, a la vista de los resultados obtenidos, la falta de lipina-1 parece no afectar la síntesis de *de novo* de TAG en macrófagos.

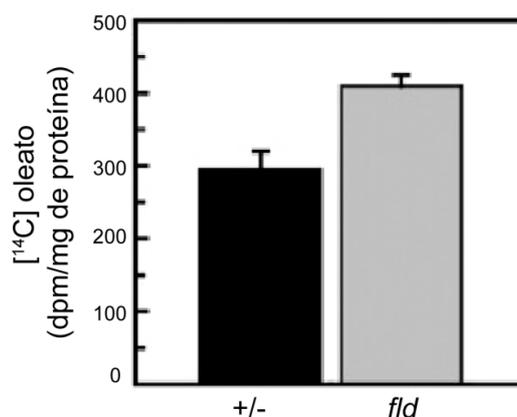


Figura 39. Incorporación de TAG en macrófagos peritoneales de ratones *fld*. Los macrófagos peritoneales obtenidos de ratones heterocigotos (+/-, barra negra), o de ratones *fld* (barra gris), fueron tratados con $[^{14}\text{C}]$ ácido oleico durante 1h y se analizó la radiactividad incorporada en TAG. La gráfica se representa como la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes.

3.2 Función de la lipina-1 en la formación de gotas lipídicas

La falta de lipina-1 no afecta a la síntesis de *novo* de TAG en macrófagos humanos, pero puesto que en estas células la lipina-1 α se localiza en gotas lipídicas, el siguiente paso fue determinar si la lipina-1 ejerce una función específica en dichos orgánulos, como por ejemplo en la producción, tamaño, distribución o forma de los mismos.

Para abordar este estudio los macrófagos humanos fueron tratados con una alta concentración de ácido oleico (200 μ M) para inducir la formación de gotas lipídicas (113, 114, 115). Tras 18h de tratamiento se tiñeron con BODIPY 493/503, se tomaron imágenes por microscopía confocal y se analizó si existían diferencias en el tamaño, forma o número de las gotas lipídicas en las células carentes de lipina-1 con respecto a las controles. En la **figura 40** se puede observar que los macrófagos deficientes en lipina-1 presentan un mayor número de gotas lipídicas aunque de menor tamaño que las células control. Además las gotas lipídicas de los macrófagos deficientes en lipina-1 se localizan a lo largo de todo el citoplasma, mientras que en las células control se disponen en la periferia del cuerpo celular. Estos resultados muestran que la lipina-1 controla la cantidad, tamaño y distribución de las gotas lipídicas en macrófagos humanos.

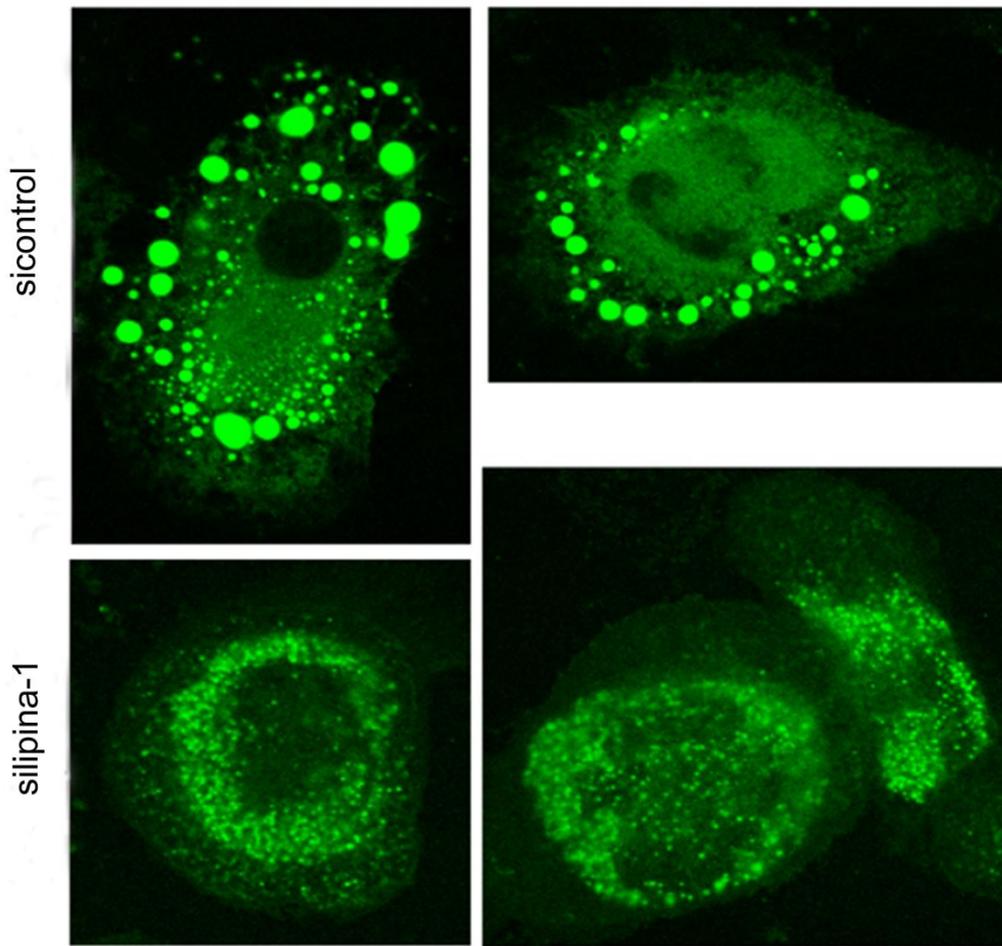


Figura 40. Análisis de las gotas lipídicas en macrófagos humanos carentes de lipina-1. Los macrófagos humanos fueron tratados con siRNA frente a lipina-1, o siRNA control durante 48 horas y se trataron con 200 μ M de ácido oleico durante 18 h. Después las células fueron marcadas con 2,5 μ g/ml de BODIPY493/503 y las gotas lipídicas se analizaron por microscopía confocal. Células representativas de un mínimo de 15.

Por otro lado, para confirmar los datos obtenidos por microscopía confocal, se realizaron análisis de esas mismas células por citometría de flujo con el fin de cuantificar más fácilmente la fluorescencia de las células. Como se muestra en la **figura 41**, la media de la intensidad de fluorescencia se duplicó en las células tras el tratamiento con ácido oleico (241 ± 10 frente a 454 ± 41), mientras que en células con baja expresión de lipina-1 el incremento fue no significativo (374 ± 18 frente a 384 ± 15). Según este análisis la lipina-1 regula la producción de gotas lipídicas en células tratadas con ácido oleico.

Todos estos datos sugieren que la lipina-1 ejerce una función inesperada en la biología de las gotas lipídicas, afectando el tamaño y producción de estos orgánulos.

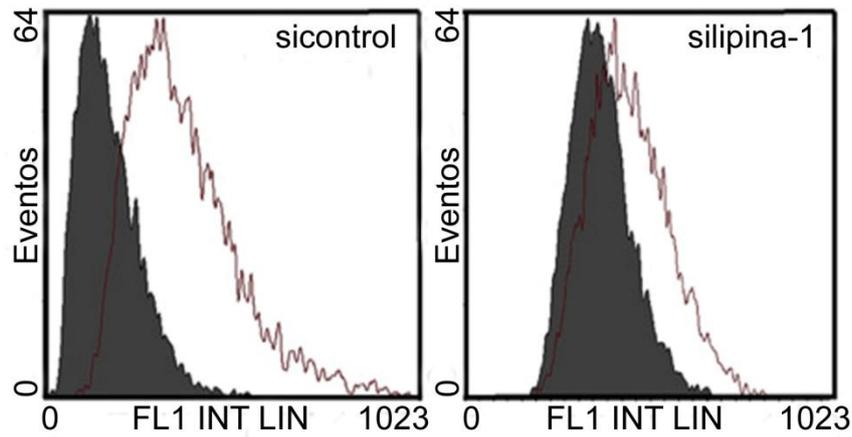


Figura 41. Análisis por citometría de flujo de las gotas lipídicas presentes en macrófagos carentes de lipina-1. Los macrófagos humanos fueron tratados con siRNA negativo, o siRNA frente lipina-1 durante 48h, después se trataron con 200 μ M de ácido oleico durante 18h. A continuación, se marcaron con 0,2 μ g/ml de BODIPY493/503 y se analizó la intensidad de fluorescencia celular por citometría de flujo. Los trazos rellenos corresponden a células sin tratar y los trazos vacíos a las células tratadas con ácido oleico. Experimento representativo de 3 con resultados similares.

Además se llevaron a cabo estudios de microscopía confocal y citometría de flujo en macrófagos peritoneales de ratones *fld*, para comprobar si la falta de lipina en estas células está provocando los cambios observados en macrófagos humanos. Como se muestra en la **figura 42**, las gotas lipídicas de los macrófagos peritoneales de los ratones *fld* son menos abundantes y de menor tamaño que las de las células control.

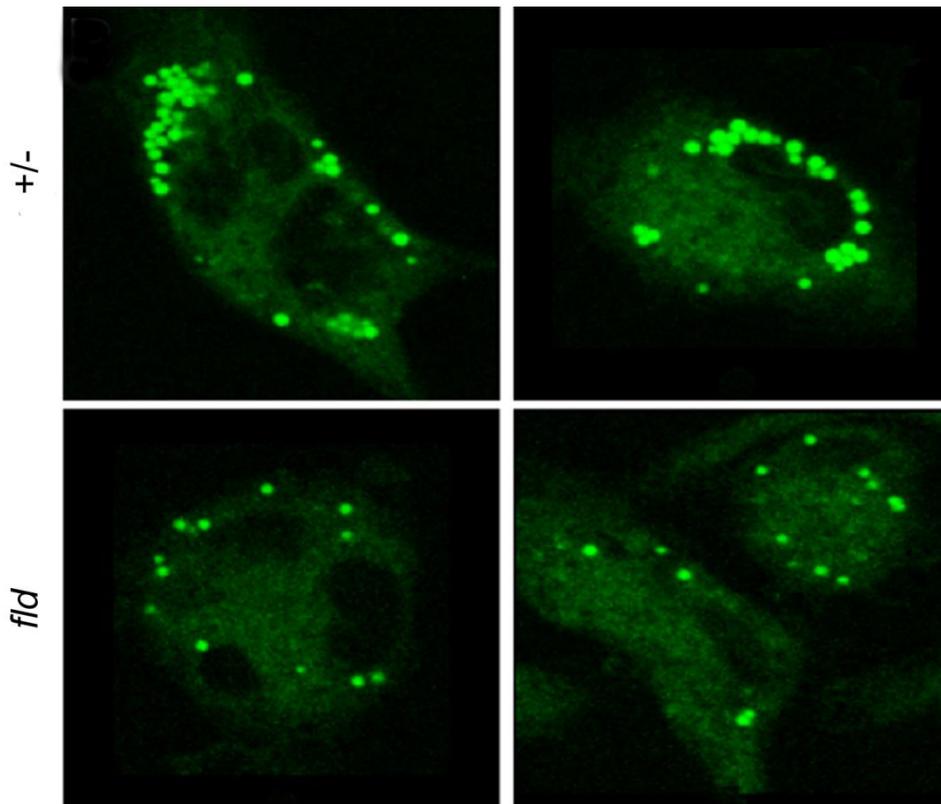


Figura 42. Análisis por microscopía confocal de las gotas lipídicas de macrófagos peritoneales de ratones *fld*. Los macrófagos peritoneales obtenidos de ratones heterocigotos (+/-), o de ratones *fld*, fueron tratados con 200 μ M de ácido oleico durante 18h. Las gotas lipídicas se marcaron con 2,5 μ g/ml de BODIPY 493/503 y se tomaron imágenes por microscopía confocal. Células representativas de un mínimo de 15.

Para obtener una cuantificación de lo observado por microscopía confocal, se llevó a cabo un análisis del tamaño y del número de gotas lipídicas en macrófagos peritoneales de ratones heterocigotos y *fld* mediante el software ImageJ1.44. Como se muestra en la **figura 43**, el tamaño de las gotas lipídicas de los macrófagos procedentes de animales *fld* de animales heterocigotos es similar, sin embargo, tras el tratamiento con ácido oleico el tamaño de las gotas lipídicas de los macrófagos *fld* es significativamente más pequeño que el de las células control. En cuanto al número de gotas lipídicas por célula, los macrófagos de los animales *fld* presentan un menor número que el de los animales control, independientemente de que estén tratados, o no, con ácido oleico. Por consiguiente los macrófagos peritoneales de ratones *fld* presentan modificaciones en el tamaño y número de las gotas lipídicas similares a las observadas en macrófagos humanos, indicando que la función de lipina-1 debe ser similar en los macrófagos de ambas especies.

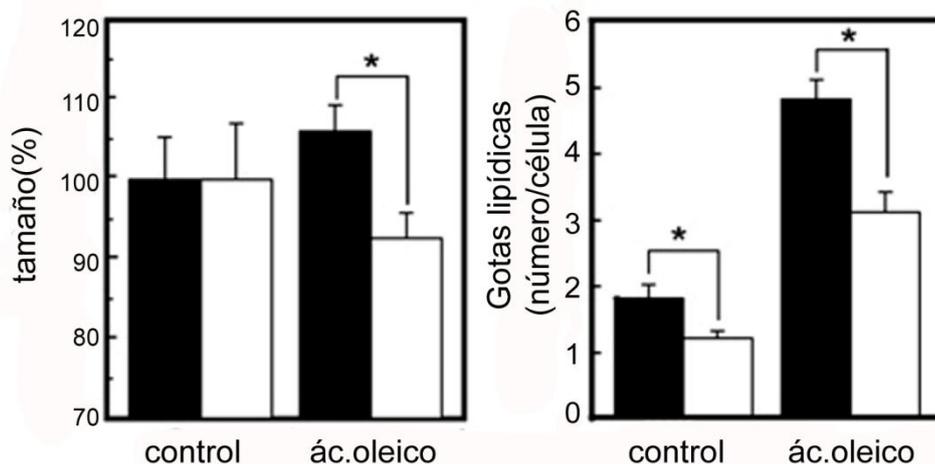


Figura 43. Cuantificación del tamaño y del número de las gotas lipídicas en macrófagos peritoneales de ratón. Los macrófagos peritoneales de ratones heterocigotos (barras de color negro) o ratones *fld* (barras de color blanco) se trataron con 100 μM de ácido oleico y se marcaron con 2,5 μM de BODIPY 493/503. Se tomaron imágenes por microscopia confocal y se cuantificó el tamaño y el número de gotas lipídicas por célula utilizando el software ImageJ1.44. La gráfica se representa como la media \pm desviación estándar de 600 células analizadas, * $p < 0,05$

Aunque la lipina-1 no está involucrada en la síntesis *de novo* de TAG en macrófagos, si parece estar jugando un papel importante en las propiedades físicas (tamaño y número) del orgánulo encargado de almacenarlos.

3.3 Perfil lipidómico de las gotas lipídicas en macrófagos deficientes en lipina-1

Para intentar elucidar el papel de la lipina-1 en las gotas lipídicas se estudió la composición de las moléculas de TAG que forman parte de las gotas lipídicas de macrófagos control y macrófagos con baja expresión de lipina-1.

Inicialmente se estudió como era la incorporación de un ácido graso como el ácido oleico en las gotas lipídicas. Para ello los macrófagos humanos transfectados con siRNA de (control o frente a lipina) se trataron con 0,5 $\mu\text{Ci/ml}$ [^{14}C] ácido oleico durante 24 horas. A continuación, las gotas lipídicas se aislaron por ultracentrifugación y se cuantificó la radiactividad de la fracción citosólica y de la fracción correspondiente a las gotas lipídicas. Las células tratadas con el siRNA negativo incorporaron un $27 \pm 1\%$ de la radiactividad total en la fracción de las gotas lipídicas, sin embargo, los macrófagos deficientes en lipina-

1 sólo incorporaron un $19\pm 2\%$ de la radiactividad total. Por tanto, la falta de lipina-1 provoca una disminución de la incorporación de ácidos grasos en las gotas lipídicas (posiblemente en TAG).

Para confirmar los datos obtenidos con trazadores radiactivos se estudió la composición de los ácidos grasos de las moléculas de TAG de toda la célula y de las gotas lipídicas por espectrometría de masas, tanto en macrófagos control como en macrófagos con una expresión de lipina-1 disminuida. Con esta metodología se detectaron 13 ácidos grasos distintos en los TAG de los macrófagos humanos, sin que su distribución o cantidad se vieran afectados por la ausencia de lipina-1 (**Fig. 44**). En cuanto a la composición del TAG de las gotas lipídicas, se observó un pequeño aumento significativo ($p < 0,05$) en los niveles de ácido mirístico (14:0) y palmítico (16:0) los macrófagos que tienen disminuida la expresión de la lipina-1 y que era contrarrestado por una disminución en la masa de ácido linoleico (18:2n-6) (**Fig. 44A**). Por tanto, la falta de lipina-1 no modifica el contenido de TAG totales pero si afecta al perfil de ácidos grasos en las gotas lipídicas, observándose pequeñas variaciones en la cantidad de los ácidos mirístico, palmítico y linoleico incorporados en TAG. Esto sugiere que la lipina-1 participa en la regulación de la composición de los TAG que componen las gotas lipídicas, sin que ello afecte a la composición de los TAG totales.

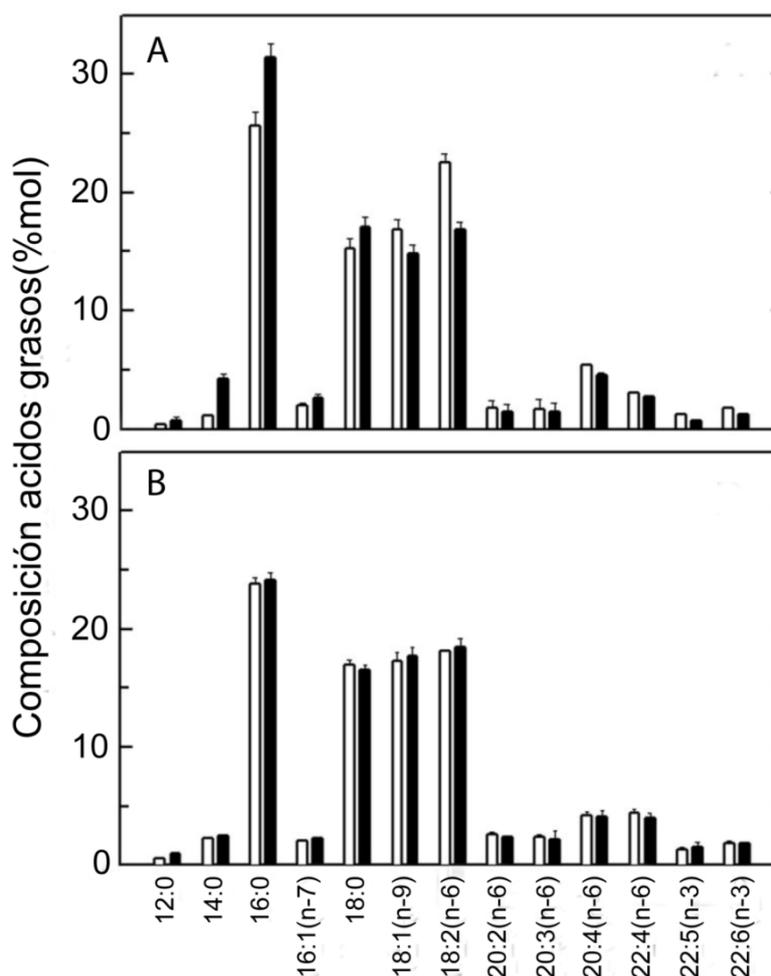


Figura 44. Contenido en ácidos grasos del TAG celular y de gotas lipídicas en células carentes de lipina-1. Los macrófagos fueron transfectados con 20nM de siRNA negativo (columnas blancas) o con 20nM de siRNA frente a lipina-1 (columnas negras) durante 48h. Los lípidos procedentes de gotas lipídicas obtenidas por ultracentrifugación (A) o de células completas (B) se extrajeron y los ácidos grasos presentes en el TAG se analizaron por GC-MS. La gráfica se representa como la media \pm desviación estándar de dos experimentos independientes realizados por triplicado.

4. La lipina-1 controla el nivel de activación de la cPLA₂ α

Estudios previos han demostrado que la actividad PAP1 podría regular la cPLA₂ α a través de la generación de DAG (75, 76, 77). Uno de los problemas metodológicos de estos trabajos es el uso de inhibidores inespecíficos de la actividad PAP1, como el propanolol o la bromoenol lactona (BEL). Por ello nos planteamos estudiar la modulación de la actividad cPLA₂ α por lipina-1 de forma más específica, utilizando siRNA.

En primer lugar se realizó un ensayo de liberación de AA en macrófagos humanos deficientes en lipina-1. Como se muestra en la **figura 45** los macrófagos que tienen

disminuida la expresión de la lipina-1 liberan de forma significativa menos AA que las células control durante el tratamiento con ácido oleico o zymosan opsonizado (partículas de las paredes de levaduras que disparan rutas de señalización celular que activan la cPLA₂α). La liberación de AA en estas condiciones desaparecía por tratamiento con un inhibidor específico de la cPLA₂α (pirrofenona), lo que confirma que la cPLA₂α es el efector de la respuesta. Por tanto, en macrófagos humanos la lipina-1 parece estar implicada en el nivel de activación de la cPLA₂α

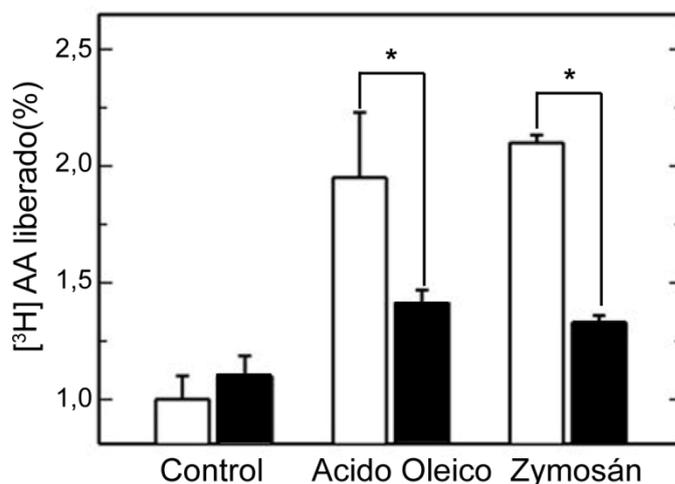


Figura 45 Liberación de [3H] AA en macrófagos deficientes en lipina-1. Los macrófagos humanos fueron transfectados con 20nM de siRNA negativo (barras blancas) o con 20nM de siRNA frente a lipina-1 (barras negras). Tras 48h, se estimularon con 100μM de ácido oleico o 1mg/ml de zymosan opsonizado durante 6 h y, a continuación, se analizó la liberación de AA al medio extracelular tal y como se indica en materiales y métodos. La gráfica se representa como la media ±desviación estándar de dos experimentos independientes realizados por triplicado, *p<0,05.

4.1 La lipina-1 control el nivel de la fosforilación de la cPLA₂α

La fosforilación en el residuo de Ser⁵⁰⁵ de la cPLA₂α incrementa la actividad de la cPLA₂α dos o tres veces(168)(169), y además favorece la unión de la cPLA₂α a membranas, aumentando así su eficiencia enzimática(170). Puesto que la lipina-1 controla el grado de activación de la cPLA₂α, se estudió a continuación si la lipina-1 también influía en el grado de fosforilación de la cPLA₂α.

Para ello se analizó con anticuerpos fosfoespecíficos dirigidos contra el residuo Ser⁵⁰⁵ de la cPLA₂α el nivel de fosforilación de la enzima en homogenizados de macrófagos deficientes en lipina-1, tratados con zymosan opsonizado a diferentes tiempos. El nivel de

fosforilación de la Ser⁵⁰⁵ de la cPLA₂α, estaba disminuido en macrófagos transfectados con el siRNA frente lipina-1 con respecto a los tratados con el siRNA negativo (**Fig. 46**). Por tanto, la lipina-1 regula el grado de fosforilación de la cPLA₂α en macrófagos humanos.

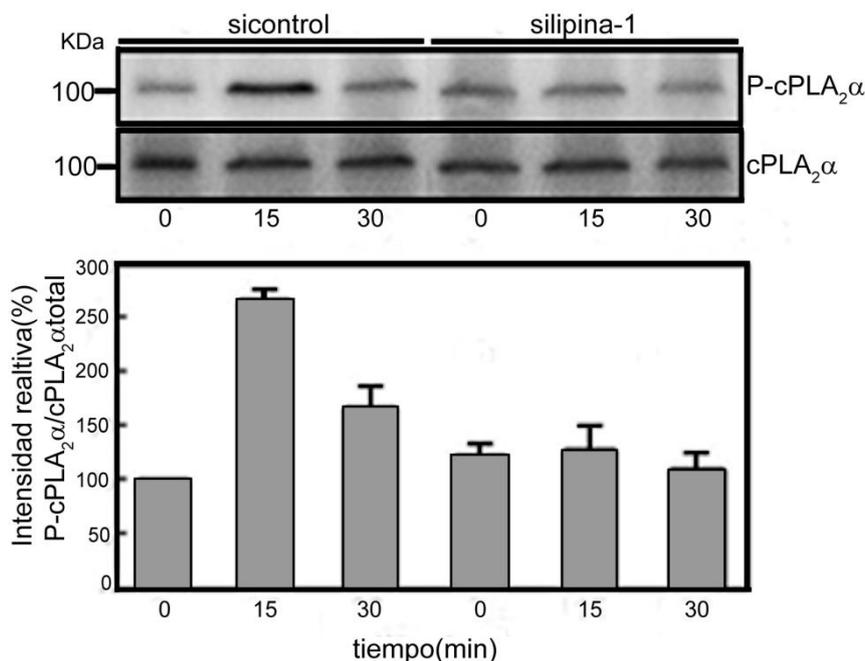


Figura 46. Fosforilación de la cPLA₂α en macrófagos deficientes en lipina-1. Los macrófagos fueron transfectados con 20nM de siRNA negativo o siRNA lipina-1, tras 48h se estimularon con 1mg/ml zymosan opsonizado durante los tiempos indicados y las proteínas celulares se analizaron por inmunoblot utilizando anticuerpos específicos frente a la Ser⁵⁰⁵ de la cPLA₂α, o a la cPLA₂α total. La intensidad relativa de la fosforilación de la cPLA₂α (panel de abajo) respecto al total de cPLA₂α se llevo a cabo mediante el software QuantityOne (BioRad). Experimento representativo de 3 con resultados similares.

4.2 La lipina-1 controla los niveles de eicosanoides producidos por los macrófagos

La liberación de AA a partir de los fosfolípidos de membranas es uno de los pasos limitantes en la síntesis de eicosanoides(171). En macrófagos humanos, la falta de lipina-1 provoca una menor liberación de AA, por lo que la síntesis de eicosanoides podría estar afectada. Para estudiar esta posibilidad, se midió la producción de prostaglandinas (PGE₂), compuestos que provienen del metabolismo oxidativo del AA, mediante ELISAs específicos para PGE₂. Los resultados mostraron que la producción de PGE₂ en macrófagos deficientes en lipina-1 es menor que en las células control (**Fig.47**).

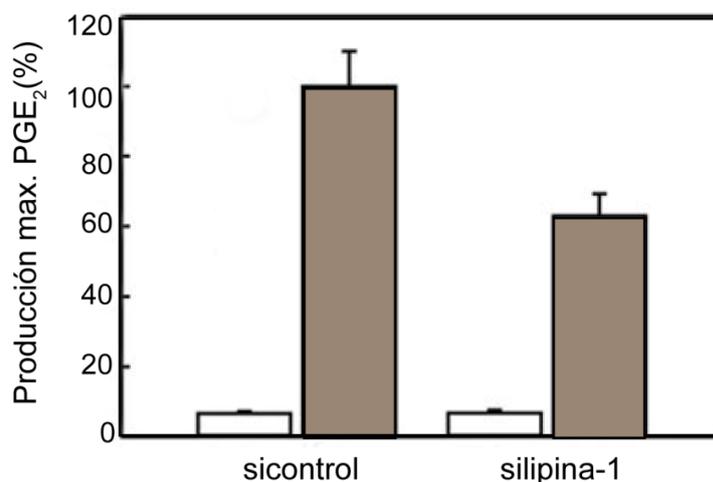


Figura 47. Producción de PGE₂ en macrófagos deficientes en lipina-1. Los macrófagos humanos fueron transfectados con 20nM siRNA negativo o siRNA contra lipina-1. Tras 48h, se estimularon (barras de color gris) o no (barras blancas) con 1mg/ml de zymosan opsonizado durante 18h, se recogieron los sobrenadantes y se analizó la producción de PGE₂ por ELISA. La gráfica se representa como la media \pm desviación estándar de dos experimentos independientes realizados por triplicado.

4.3 Otros mecanismos que intervienen en la regulación de la actividad cPLA₂ α por lipina-1

La actividad PAP1 de las lipinas además de ser importante para la ruta de biosíntesis de TAG, también lo es para la síntesis de fosfolípidos(166). Es posible, por tanto, que la lipina-1 esté afectando a los niveles de fosfolípidos esterificados con AA, disminuyendo la disponibilidad de sustrato para la cPLA₂ y consecuentemente su actividad.

Para estudiar esta posibilidad, en primer lugar se analizó la distribución de AA en los glicerofosfolípidos de macrófagos deficientes en lipina-1 mediante cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS), y se compararon los resultados con los de células control. Los resultados demostraron que la carencia de la lipina-1 no altera de manera significativa la distribución de AA en los fosfolípidos (**Fig. 48**), descartando la posibilidad de que disminución en actividad de la cPLA₂ α en macrófagos deficientes en lipina-1 se deba a una menor disponibilidad de sustrato.

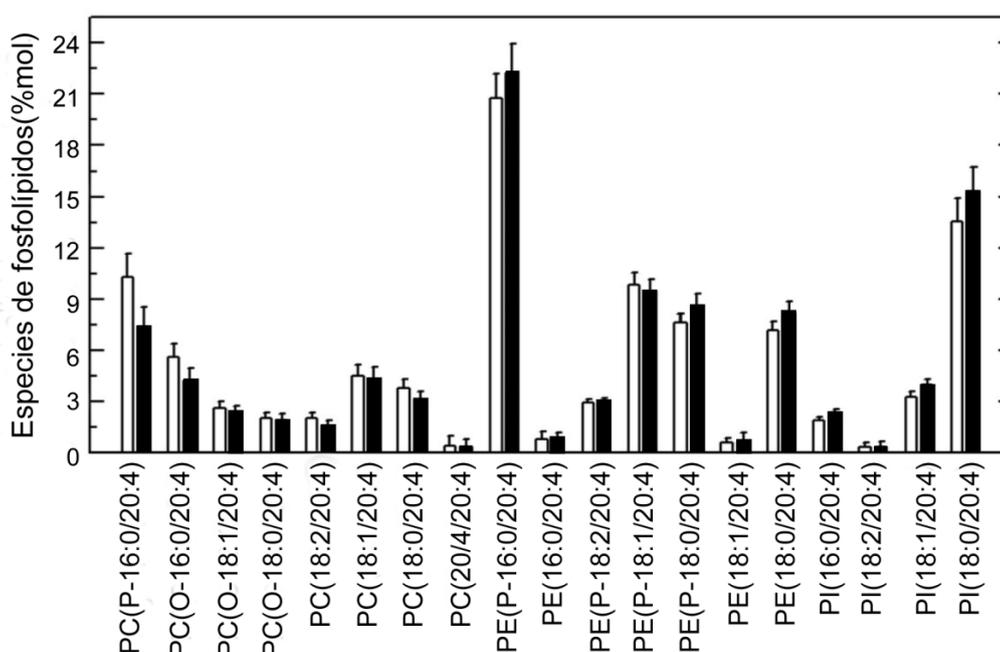


Figura 48. Análisis de los glicerofosfolípidos que contienen AA en macrófagos humanos. Las células fueron transfectadas a una concentración final de 20 nM de siRNA negativo (barras blancas) o 20 nM de siRNA frente a lipina-1 (barras negras) durante 48h. Los lípidos totales se extrajeron por el método de Bligh y Dyer, y se analizaron las especies de se fosfolípidos por cromatografía acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS). La gráfica se representa como la media \pm desviación estándar de dos experimentos independientes realizados por triplicado.

Puesto que los niveles de DAG en las membranas condicionan la accesibilidad de la $cPLA_2\alpha$ a los fosfolípidos de estas, existe la posibilidad de que lipina-1 afecte a los niveles de DAG celulares, y con ello la actividad $cPLA_2\alpha$. El siguiente paso en nuestra experimentación fue analizar el contenido de DAG en macrófagos humanos deficientes en lipina-1 por GS-MS y compararlo con el de células control. El resultado, mostrado en la figura 41, demostró que los macrófagos deficientes en lipina-1 tenían niveles de DAG disminuidos con respecto a los macrófagos control. Por GM-MS se identificaron 10 ácidos grasos formando parte del DAG, de los cuales el ácido pentadecenoico (15:0), sapiénico (16:1n-10), oleico (18:1 n-6), araquídico (20:0) y el adrenico (22:4) se encontraban disminuidos en las células deficientes en lipina-1 (**Fig. 48B**).

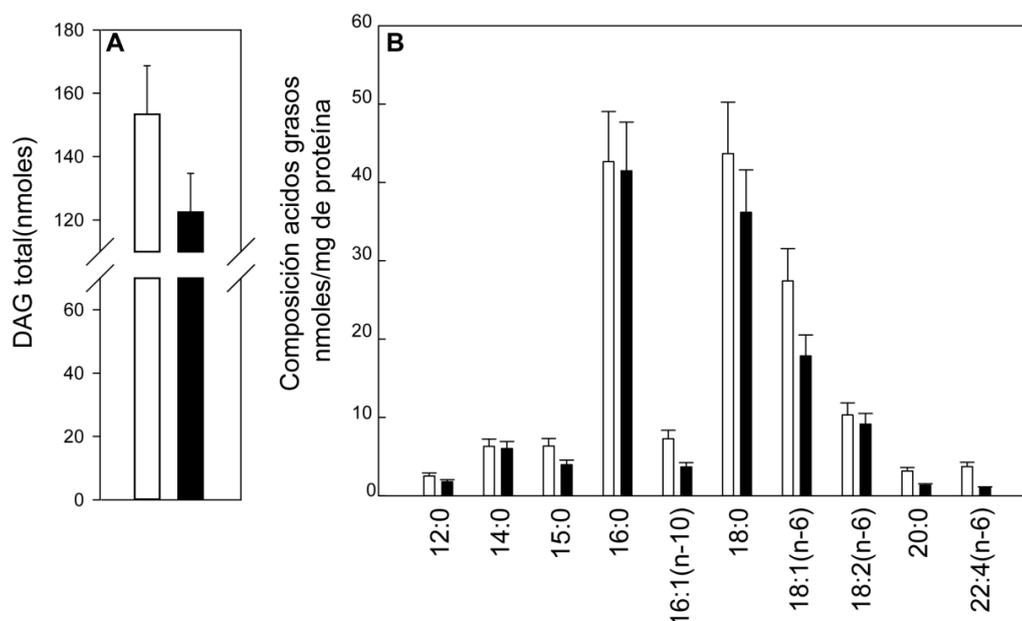


Figura 48. Efecto del silenciamiento génico de la lipina-1 sobre la composición y masa de los ácidos grasos que forman parte del DAG en macrófagos humanos. Los macrófagos humanos se trataron con una concentración final de 20nM de siRNA negativo (barras blancas), o con 20nM siRNA frente a lipina-1 (barras negras). Los lípidos se separaron por TLC y el DAG se analizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). La gráfica se representa como la media \pm desviación estándar de dos experimentos independientes realizados por triplicado.

5. Papel de la cPLA₂ α y la lipina-1 en la biología de las gotas lipídicas

En el presente trabajo se ha demostrado el papel de la lipina-1 en la regulación del tamaño y número de gotas lipídicas y también en la modulación de la actividad cPLA₂ α en macrófagos humanos. La cPLA₂ α ha sido relacionada con la biogénesis de las gotas lipídicas inducida por suero en células CHO-K1(113, 115). Por ello, se planteó como último objetivo conocer la relación de estas enzimas (cPLA₂ α y lipina-1 α y -1 β) en el proceso de biosíntesis de gotas lipídicas. Se realizaron por un lado experimentos de microscopía confocal sobrexpresando quimeras de cada una de ellas con proteínas fluorescentes en células HEK 293. Estas células se eligieron porque se transfectan muy bien. Los resultados, mostrados en la **figura 49** señalan que tanto la lipina-1 α como 1 β colocalizan con la cPLA₂ α . Hay que hacer notar que la lipina-1 β no tiene en células HEK una localización tan definida como en macrófagos humanos, y que aunque también está en la membrana de las gotas lipídicas, una buena parte parece estar en el citosol celular. Tanto la lipina-1 β como la cPLA₂ α tienen localización citosólica, aunque la cPLA₂ está enriquecida en las membranas de las gotas lipídicas, donde colocaliza con la lipina-1 α .

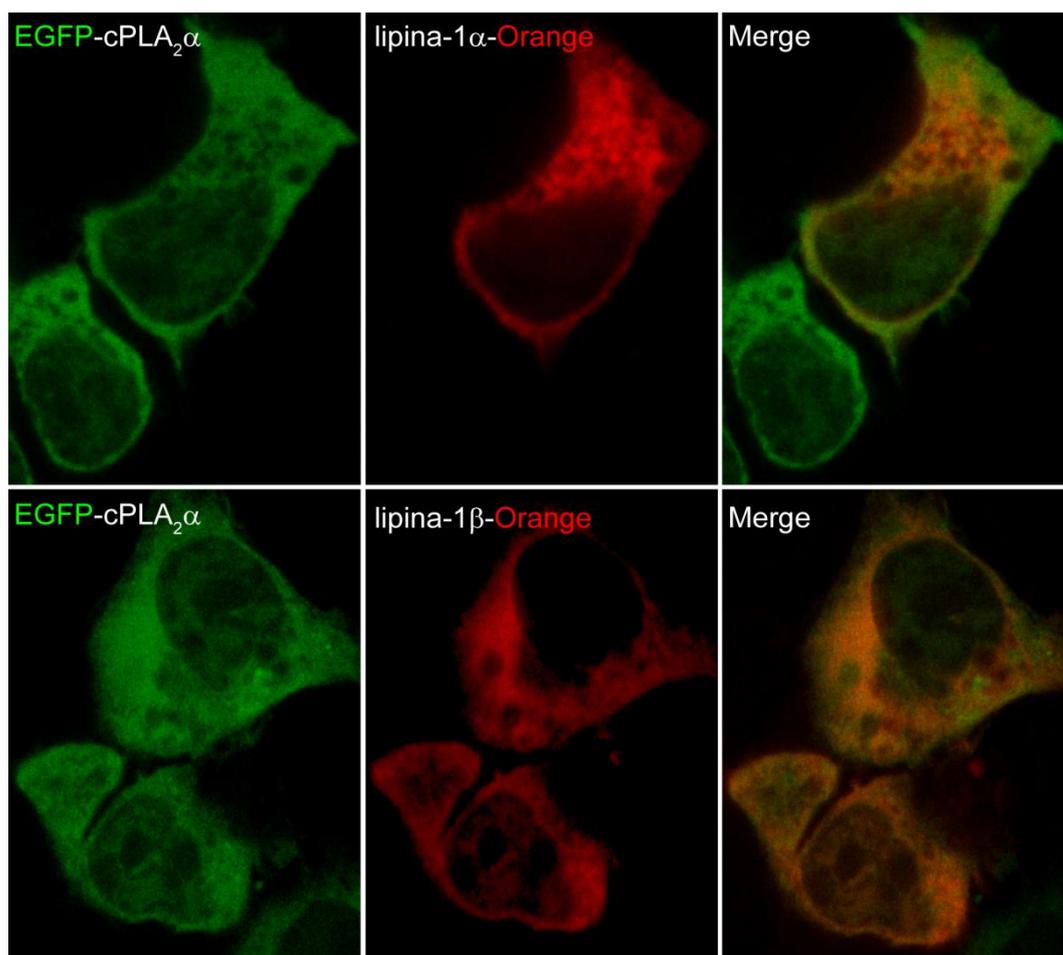


Figura 49. Localización de la cPLA₂α, lipina-1α y-1β en células HEK 293. Las células fueron transfectadas con Lipofectamina 2000 y los siguientes plásmidos, según se indica: 2μg de cPLA₂α-EGFP, ó 1μg de cPLA₂α-EGFP + 1μg lipina-1α-Orange, ó 1μg de cPLA₂α-EGFP + 1μg lipina-1α-Orange. Tras 48 h se tomaron imágenes por microscopía confocal. Células representativas de un mínimo de 15.

Por otro lado, se analizó, cuáles eran las consecuencias de sobreexpresar estas enzimas en la producción de gotas lipídicas. Para ello, las células HEK293 se transfectaron de nuevo con las combinaciones EGFP-cPLA₂α y lipina-1α-Orange por un lado, y EGFP-cPLA₂α y lipina-1β-Orange por otro. También se transfectaron células únicamente con cPLA₂α-EGFP, como control. Tras 24h de transfección, se tiñeron con Oil-Red, que se une a los lípidos neutros de las gotas lipídicas y les confiere un color rojo intenso. Este colorante tiene la peculiaridad de absorber a una longitud de onda de 500nm, por lo que la cantidad de colorante unido a las células se puede cuantificar (155). Como muestra **la figura 50**, la presencia de lipina-1α tiene un mayor efecto que la lipina-1β en la generación de gotas lipídicas tras estimulación con ácido oleico con respecto a las células tranfectadas sólo con cPLA₂α. La estimulación con suero (10% FBS) no generó más gotas lipídicas en ninguna de

las condiciones ensayadas. Estos datos han sido confirmados por citometría de flujo de estas mismas células (**Fig. 50C**). La media de la intensidad de fluorescencia es mayor en las células que contienen lipina-1 α tras el tratamiento con ácido oleico con respecto a las células transfectadas sólo con cPLA₂ α , tanto en condiciones basales (150 \pm 19 frente a 193 \pm 26) como tras la estimulación con ácido oleico (211 \pm 32 frente a 303 \pm 41), mientras que la estimulación con suero no incrementa la producción de gotas lipídicas en estas células.

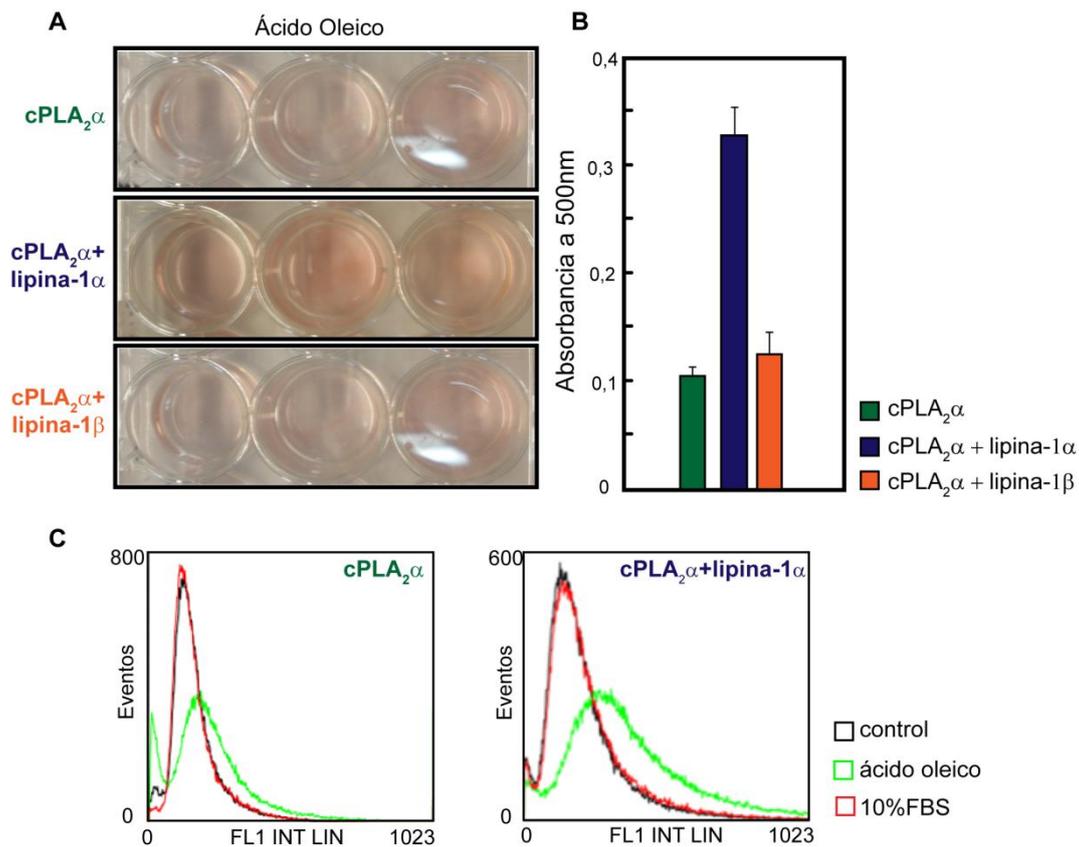


Figura 50. Análisis de la producción de gotas lipídicas en células HEK 293. Las células fueron transfectadas con Lipofectamina 2000 y los siguientes plásmidos, según se indica: 2 μ g de EGFP-cPLA₂ α , ó 1 μ g de EGFP-cPLA₂ α + 1 μ g lipina-1 α -Orange, ó 1 μ g de EGFP-cPLA₂ α + 1 μ g lipina-1 α -Orange. Tras 24h de las células se tiñeron con Oil-Red, se fotografiaron(A) y el colorante incorporado en las células se cuantificó midiendo la absorbancia a 500nm (B).Paralelamente, estas células se marcaron con 0,2 μ g/ml de BODIPY493/503 y se analizó la intensidad de fluorescencia celular por citometría de flujo(C).

Por todo ello, la lipina-1 α es la isoforma de lipina-1 que parece regular la producción de gotas lipídicas a través de la activación de la cPLA₂ α .

6. Localización subcelular de la lipina-2 y lipina-3

6.1 Lipina-2

Los macrófagos humanos expresan lipina-2, pero los anticuerpos disponibles en el mercado no son adecuados para realizar inmunocitoquímica, y por ello el estudio de la localización de esta proteína se llevó a cabo transfectando el plásmido lipina-2-EGFP, que expresa la lipina-2 humana unida por su extremo C-terminal a la proteína fluorescente. En esas condiciones se observó un patrón de distribución heterogénea de la fluorescencia asociada a lipina-2 (**Fig. 51**). Si bien todas las células presentaban fluorescencia en el citoplasma, un 75% de las células presentaban mayor fluorescencia en una amplia zona cercana al núcleo (Fig. 17 parte superior), mientras que en el resto de la población no presentaban esta acumulación citoplásmica y parte de la fluorescencia pasaba al núcleo celular (Fi. 17 parte inferior). Esto se observa mucho mejor en una representación de la fluorescencia en pseudocolor realizada con el software ImageJ 1.44. En este análisis, cada color representa un valor de intensidad de fluorescencia, siendo los colores cálidos los que mayor intensidad de fluorescencia representan y los colores fríos los de menor intensidad (**Fig. 51**).

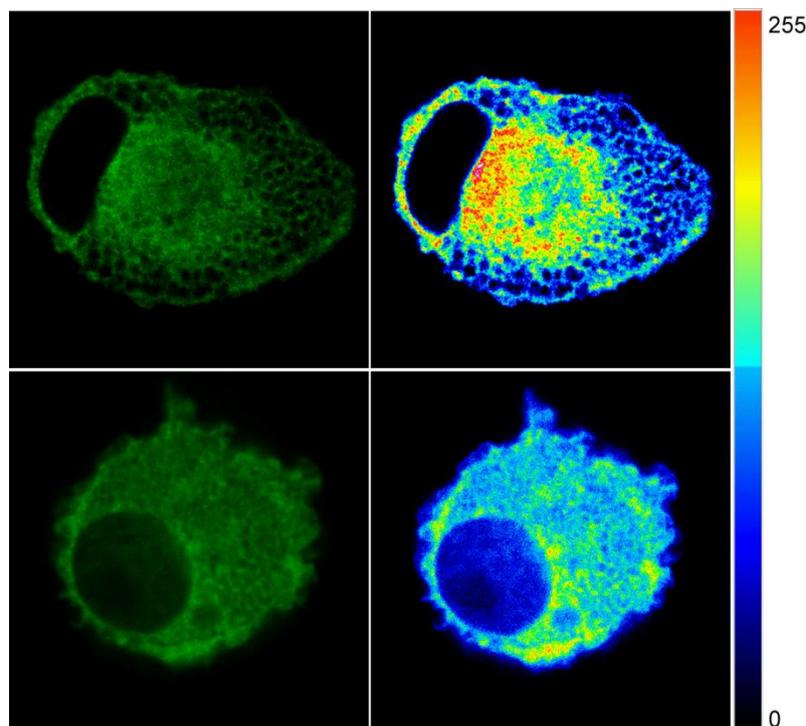


Figura 51 Localización subcelular de la lipina-2 en macrófagos humanos. Los macrófagos humanos fueron transfectados con lipina-2-EGFP y analizados por microscopia confocal. El análisis de la intensidad de fluorescencia en pseudocolor se realizó mediante el software ImageJ 1.44.

Para confirmar la presencia de la lipina-2 en el núcleo, se llevó a cabo un análisis de colocalización de la fluorescencia de la lipina-2-EGFP con la fluorescencia del DAPI, un fluoróforo que se usa para teñir los núcleos debido a su afección por los ácidos nucleicos, utilizando el software ImageJ 1.44. Se obtuvo así una máscara de colocalización que muestra en blanco aquellos píxeles que contienen fluorescencia de los 2 canales (azul y verde) (**Fig. 52**). La máscara se produce generalmente en un anillo en la zona más externa del núcleo. Por el momento no sabemos el significado de esta localización, aunque muy posiblemente tenga que ver con la actividad de coactivador transcripcional que esta proteína puede realizar.

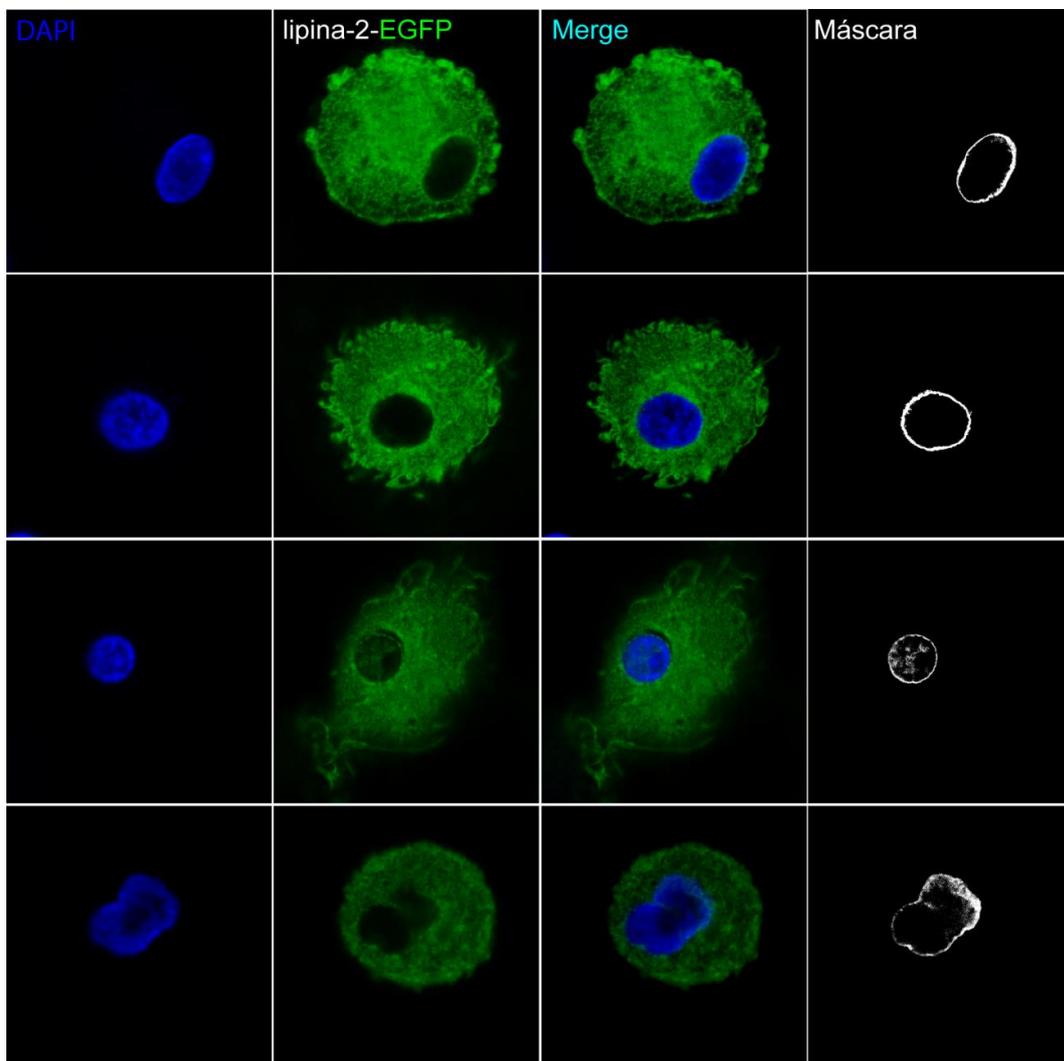


Figura 52. Análisis de colocalización de la Lipina-2 y DAPI Los macrófagos humanos fueron transfectados con lipina-2-EGFP (verde), se marcaron los núcleos con DAPI (azul) y se tomaron imágenes por microscopía confocal. Los píxeles que contienen fluorescencia verde y azul se muestran en una máscara de colocalización blanca generada con el *software* ImageJ1.44

Posteriormente nos planteamos si la cantidad de lipina-2 presente en el núcleo podía aumentar tras la estimulación celular. Para ello se trató las células con fuertes estímulos celulares como el forbol 12-miristato13 acetato (PMA), estímulos inmunes potentes como el lipopolisacárido (LPS) más interferón γ (IFN γ), o estímulo metabólico que además induce la formación de gotas lipídicas como el ácido oleico (**Fig. 53**). El análisis por microscopía confocal mostró que ninguno de los estímulos utilizados induce la translocación de la lipina-2 al núcleo o a ninguna otra estructura celular, al menos en las condiciones ensayadas.

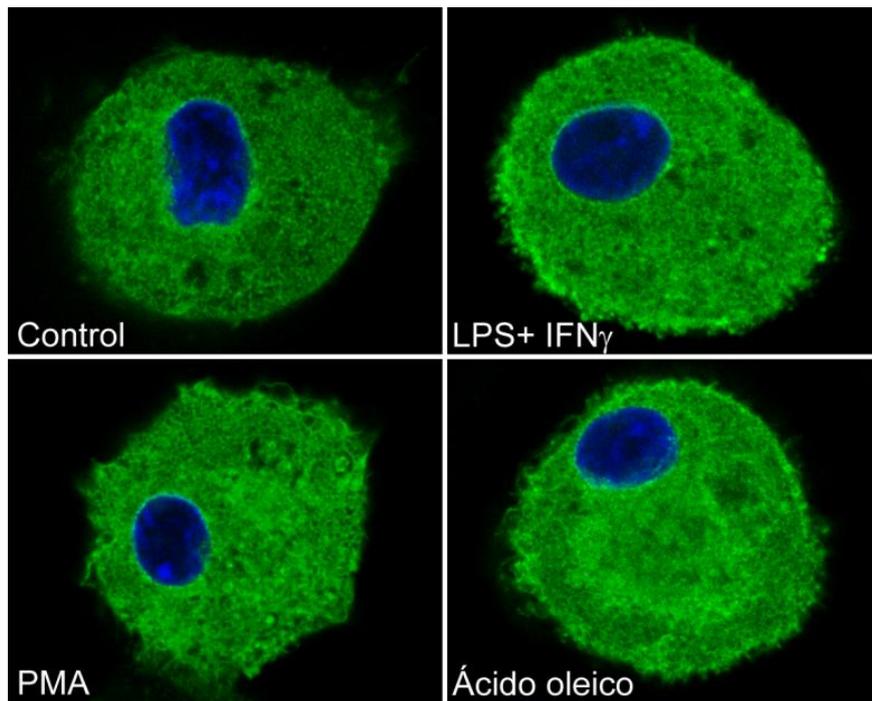


Figura 53. La localización de la lipina-2 no cambia tras estimulación de los macrófagos. Los macrófagos transfectados con lipina-2-EGFP se trataron con 80 nM de PMA, 10 ng/ml LPS +500U de IFN γ , o 200 mM de ácido oleico durante 30 minutos y se analizaron por microscopía confocal.

Se ha descrito en otros modelos celulares que la lipina-2 se localiza en RE(21). Por ello se planteó comprobar si en macrófagos humanos existe esta asociación y para ello se utilizó un marcador fluorescente de ER, ER-Tracker-Red. Como muestra la **figura 54**, en algunas células (como la de la imagen superior) la fluorescencia verde de la lipina-2-EGFP parece rodear las estructuras marcadas con fluorescencia roja procedente del ER-Tracker, pero no colocalizar con ella. De hecho, un análisis de colocalización realizado con el *software* Image 1.44 dio un valor negativo ($-0,25 \pm 0,066$) y no se generó máscara de colocalización. Por tanto, en macrófagos humanos la lipina-2 no está en el RE.

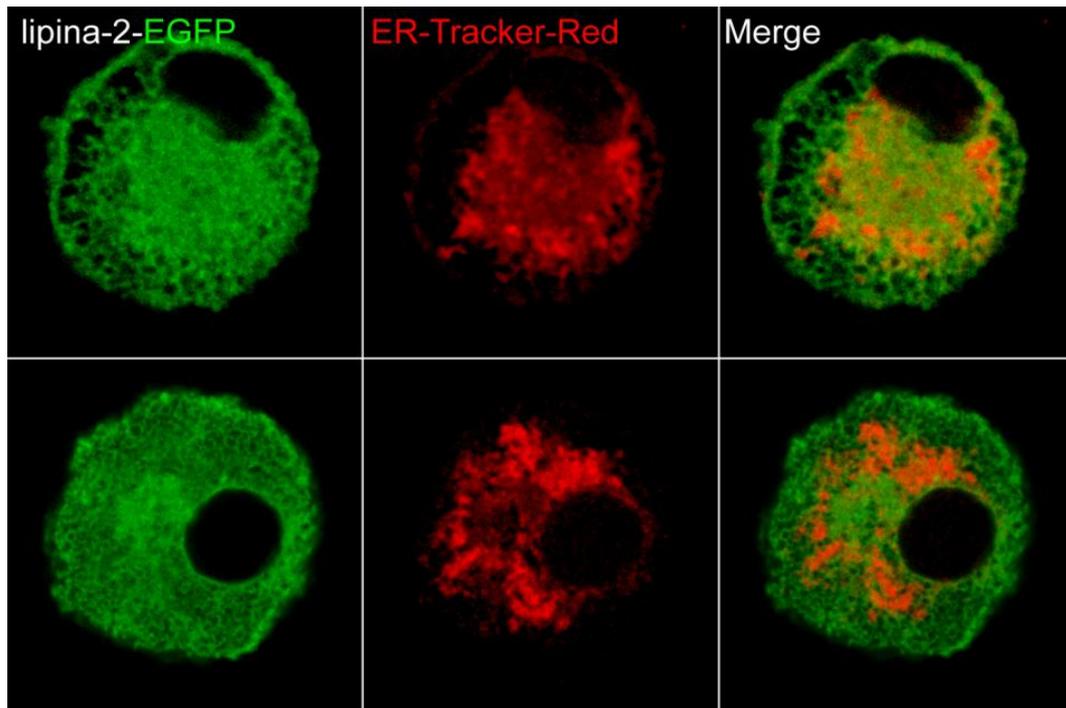


Figura 54. La lipina-2 no colocaliza con el RE. Los macrófagos humanos fueron transfectados con lipina-2-EGFP, se marcaron con ER-Tracker-Red y se analizaron por microscopía confocal.

6.2 Lipina-3

La lipina-3 es el miembro de la familia lipina menos conocido y estudiado. Para llevar a cabo los estudios de localización en macrófagos humanos, se construyó el plásmido lipina-3-EGFP. El análisis de macrófagos transfectados con dicho plásmido por microscopía confocal, mostró que la lipina-3 se localizaba en una región cercana al núcleo, de forma similar a la lipina-2 (**Fig. 55**), y en algunas células también se encontraba enriquecida en acúmulos cercanos al núcleo o en la membrana plasmática.

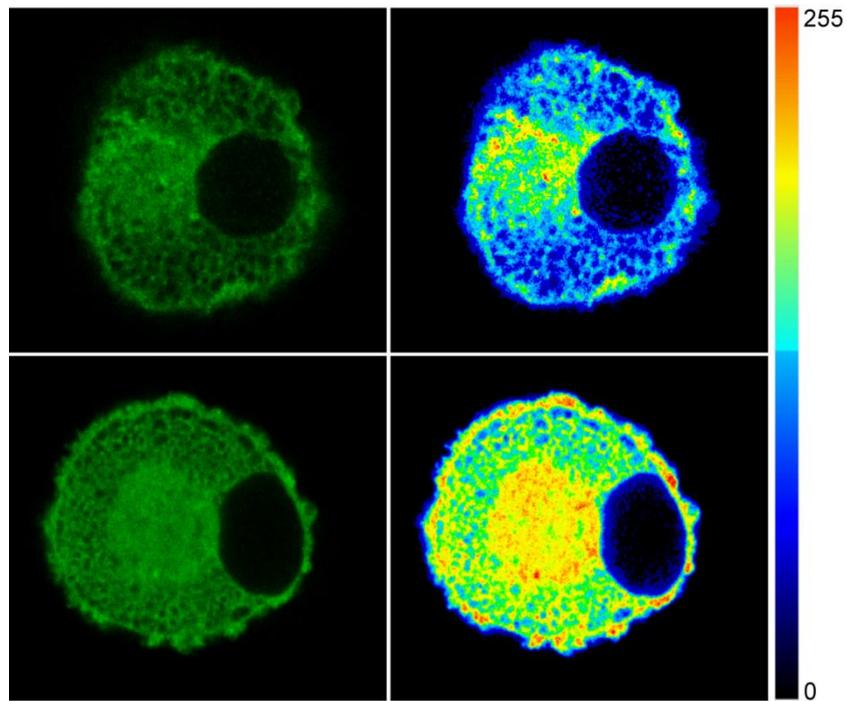


Figura 55. Localización subcelular lipina-3-EGFP. Los macrófagos humanos fueron transfectados con lipina-3-EGFP y se tomaron imágenes con el microscopio confocal. Con el software ImageJ1.44 se realizó un análisis de la fluorescencia y se representó en pseudocolor, donde los colores cálidos muestran el máximo de fluorescencia y los colores fríos la mínima.

También se realizaron análisis de localización en ER mediante tinciones con ER-Tracker-Red (**Fig. 56**). Los resultados mostraron que la lipina-3 no se encuentra asociada al RE, ya que el índice de colocalización fue negativo ($-0,27 \pm 0,048$).

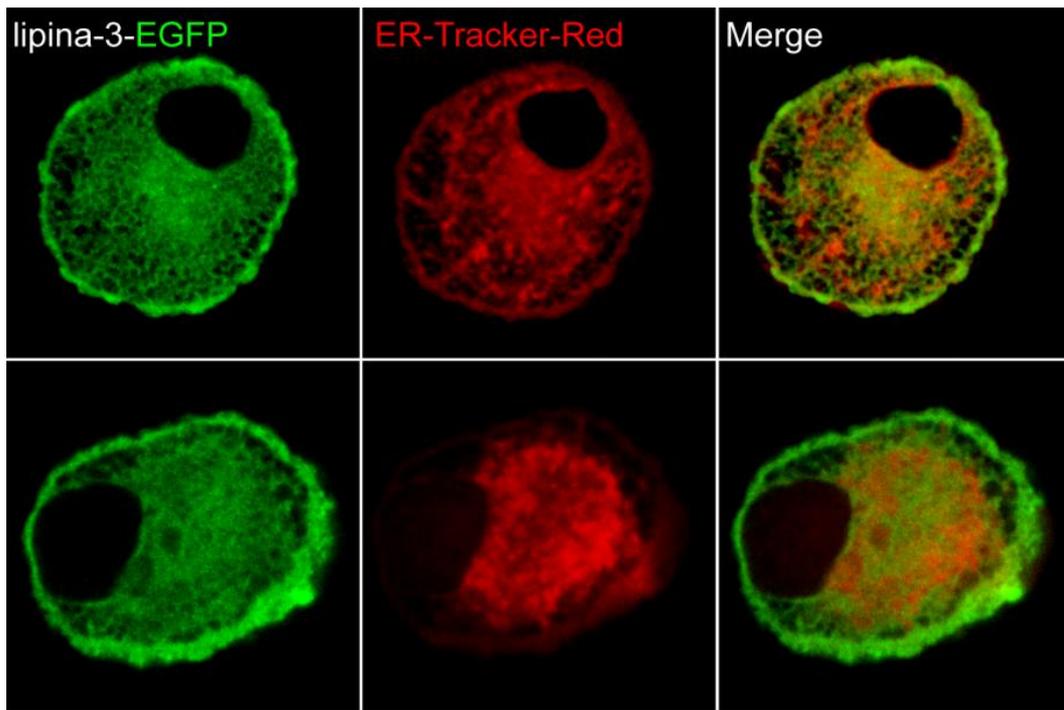


Figura 56. Análisis de colocalización de la Lipina-3 con RE. Los macrófagos humanos fueron transfectados con el plásmido lipina-3-EGFP, teñidos con ER-Tracker-Red y analizados por microscopía confocal. Se muestran los canales de fluorescencia verde, roja y la superposición de ambas (amarilla, merge). El análisis de pseudocolor se realizó con el *software* ImageJ 1.44.

DISCUSIÓN

La mayoría de los estudios realizados sobre las lipinas se han llevado a cabo en tejidos metabólicamente activos, como el tejido adiposo o el hígado, pero se sabe poco sobre su expresión o actividad en tejidos o células del sistema inmune.

En la presente memoria de investigación se ha abordado el estudio de las proteínas de la familia lipina en células del sistema inmune innato, los macrófagos. Los datos obtenidos nos han permitido conocer la localización subcelular de la lipina-1, -2 y -3, así como la función de la lipina-1 en orgánulos celulares de almacenamiento de lípidos neutros, las gotas lipídicas. Con ello hemos aprendido que enzimas con una clara actividad metabólica son capaces de influenciar, además del metabolismo celular, otros procesos celulares importantes, como la capacidad macrofágica de producir lípidos proinflamatorios. Estos resultados nos hacen reflexionar sobre la complejidad de los procesos celulares y sobre la gran conexión existente entre los procesos metabólicos e inmunes.

1. Expresión de las lipinas en la diferenciación macrofágica

Los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo demuestran que los monocitos y los macrófagos derivados de monocitos humanos expresan ARNm para la lipina-1 α , -1 β , -2 y -3 de forma constitutiva. Durante los primeros estadios (horas) del proceso de diferenciación a macrófago se produce un incremento de los niveles de ARNm, que después disminuyen, pero se mantienen por encima de los niveles basales iniciales. A nivel de proteína, las lipinas se detectan a partir del primer día de diferenciación y se mantienen hasta el final del proceso. El papel directo que cada una de las posibles lipinas puedan desempeñar en el proceso de diferenciación *per se*, no se ha podido demostrar, debido fundamentalmente a la falta de herramientas eficaces para hacerlo. Hoy en día una de las maneras de saber si una proteína está implicada en un proceso biológico, o no, es eliminando la producción de dicha proteína disminuyendo los niveles de ARNm por medio de siRNAs específicos, o bien aumentando su expresión mediante plásmidos que codifiquen para esa proteína. Ambas estrategias necesitan que las células sean transfectadas, bien con oligonucleótidos, bien con plásmidos. Los monocitos humanos presentan una bajísima eficiencia de transfección con todos los procedimientos que se han probado en el laboratorio: virus (adenovirus), nucleofección, lípidos catiónicos del tipo de las Lipofectaminas, etc... Por lo que esta metodología, por el momento, es no apta para el estudio de la diferenciación macrofágica. Otras de las herramientas que se podrían utilizar

son los inhibidores de actividad. No existen inhibidores específicos para las lipinas. Históricamente, los inhibidores más utilizados para el estudio de la función de estas proteínas son: el NEM que además de ser inespecífico no es permeable a las membranas celulares, por lo que únicamente se ha utilizado en ensayos “in vitro”; el propanolol, que también es un conocido bloqueante β -adrenérgico; el BEL, que además inhibe la iPLA2. Todos ellos inhiben todas las actividades lipina, por lo que tampoco nos permitirían conocer el papel individual de cada lipina en el proceso de diferenciación.

En la literatura se encuentran referencias en las que se ha estudiado el papel de las lipinas en otros procesos madurativos celulares, como por ejemplo en la maduración adipocítica. El preadipocito expresa altos niveles de lipina-2 y bajos niveles de lipina-1. Durante la diferenciación produce una disminución de la expresión de la lipina-2 y un aumento de las lipinas -1α y $-\beta$, que participan a su vez en el proceso de diferenciación, activando la expresión de factores adipogénicos y de síntesis lipídica respectivamente(21).

El hecho de que durante la diferenciación macrofágica se induzca la expresión de las lipinas debe atender a las funciones intrínsecas del macrófago. Por ejemplo, durante la fagocitosis estas células necesitan aumentar la superficie de las membranas, para lo que necesitan fosfolípidos celulares ya disponibles o de nueva síntesis. Además la fagocitosis es un proceso muy costoso desde el punto energético, por lo que la célula necesita un buen almacén de energía del que poder sacar las moléculas de ATP necesarias para ello. Las lipinas tienen una importante función en ambos casos, por un lado en la generación de fosfolípidos y por otra en la generación de lípidos de almacenamiento de energía como el TAG. Apoyando esta idea, existe un estudio donde se ha descrito el papel de la lipina-1 en el incremento de la síntesis de fosfolípidos que acompaña al aumento de RE que tiene lugar durante la diferenciación de los linfocitos B(172).

Por otro lado, tanto el DAG como el PA son moléculas esenciales en la señalización intracelular durante la respuesta macrofágica(173, 174), ya que se producen después de la estimulación de receptores de membrana que regulan la respuesta inmune, como los receptores de inmunoglobulinas, los TLRs, o los receptores de quimioquinas. El PA controla la activación de múltiples enzimas claves en transducción de señal como la PIP5quinasa, Raf-1, la kinasa supresora de Ras, mTOR, PKC ϵ , o la p47^{PHOX} de la NADPH oxidasa; mientras que el DAG activa gran parte de las proteínas de la familia de las PKCs, las chimaerinas, RasGRPs (proteínas reguladoras de Ras por intercambio de nucleótidos de guanina) y las diacilglicerol quinasas. Puesto que los macrófagos, y no los monocitos,

son las células efectoras de la respuesta inmune innata, no es extraño que las lipinas aumenten su expresión en el macrófago para regular de forma más eficiente los niveles de estos dos lípidos.

2. Localización de la lipina-1 en macrófagos humanos

La localización subcelular de la lipina-1 ha sido estudiada en muchos tipos celulares como preadipocitos, adipocitos maduros(6, 58), células de hepatoma de rata McA-RH7777(59) y células neuronales SH-SY5Y(28). En todas ellas la lipina-1 α predomina en núcleo y la lipina-1 β en el citoplasma celular.

En este trabajo se describe a la lipina-1 α como una proteína localizada en gotas lipídicas macrofágicas, aportando una nueva localización para la lipina-1 α no descrita hasta el momento en células de mamíferos. La localización de la lipina-1 α en gotas lipídicas se ha demostrado mediante estudios de colocalización por microscopía confocal con ADRP, TIP47, dos proteínas de la superficie de estos orgánulos, y por tinción de los lípidos neutros con Rojo Nilo. También hemos encontrado que la lipina-1 α se asocia a las gotas lipídicas por su cara citosólica y no se encuentra en el interior del orgánulo.

En *Drosophila Melanogaster* se ha descrito recientemente que la proteína heteróloga a lipina en esta especie se localiza también en gotas lipídicas(175). Posteriormente, se ha demostrado que la lipina-1 γ en presencia de ácido oleico se transloca desde membranas microsomales a la superficie de las gotas lipídicas en células COS-7 y HepG2(176).

En macrófagos humanos la lipina-1 α no parece cambiar de compartimento celular ni siquiera en condiciones de estimulación celular, bien sea con estímulos que producen una respuesta inmune, como el LPS, con estímulos que inducen una fuerte activación del macrófago, como el PMA o la ionomicina, o con un estímulo metabólico como el ácido oleico. Del mismo modo, se ha demostrado en este trabajo que la actividad PAP no interviene en la localización de la lipina-1 α , puesto que la mutación del sitio activo no altera la localización de la misma.

El estudio de la localización de la lipina-1 α endógena de macrófagos tuvo que abordarse mediante técnicas de fraccionamiento celular, debido a que los anticuerpos

disponibles frente a lipina-1 α (tanto el diseñado en nuestro laboratorio, como los anticuerpos comerciales) reconocen muchas otras proteínas en lisados celulares, y por tanto su uso no permitiría estudiar por inmunocitoquímica de una forma inequívoca la localización de la lipina-1 α en las células. El hecho de que la lipina-1 sólo aparezca en las fracciones citosólica y de gotas lipídicas, y no en la fracción de membrana, corroboraba los resultados obtenidos por microscopía con quimeras fluorescentes. Puesto que el anticuerpo utilizado en estos experimentos reconoce un epítipo que está presente en la lipina-1 α y -1 β , en principio no podríamos distinguir cual de las dos isoformas es la que está presente en cada fracción. Sin embargo, el hecho de que la banda proteica que aparece en la fracción de gotas lipídicas sea de menor tamaño aparente que la banda que aparece en la fracción citosólica, nos hace pensar que la proteína reconocida en la primera fracción (gotas lipídicas) es la lipina-1 α (890 aa), mientras que la proteína que aparece en la segunda fracción (citosólica) es la lipina-1 β (923 aa). Esta idea estaría de acuerdo con las localizaciones encontradas en microscopía confocal.

Las gotas lipídicas son los únicos orgánulos celulares rodeados de una sola monocapa de fosfolípidos en lugar de una bicapa, por lo que las proteínas que se unen a las gotas lipídicas deben tener secuencias especiales que les permitan anclarse a ellas. Las proteínas PAT que se localizan en la superficie de las gotas lipídicas, no contienen motivos de unión a membranas definidos y por tanto se unen a estas por mecanismos distintos. La cristalización de la proteína TIP47 ha mostrado que existe en el dominio C-terminal de esta proteína una estructura de cuatro hélices anfipáticas que le permitiría unirse a los lípidos de las membranas(90). Este tipo de estructuras ya se habían identificado con antelación en el dominio N-terminal de la apolipoproteínaE, y se había demostrado que cuando esa proteína se une a lípidos lo hace intercalando sus cuatro hélices en la superficie de las membranas (177)(178). Otras proteínas que también se anclan a gotas lipídicas como la DAGT2 y la caveolina lo hacen mediante una larga estructura hidrofóbica en forma de horquilla en la parte central de la proteína que permite que los extremos N y C de esta queden expuestas al lado citosólico. En la secuencia de la lipina-1 α , como en el resto de las proteínas lipinas y las PATs, no existen motivos definidos de unión a membranas, y desconocemos por el momento su posible estructura secundaria y terciaria, sin embargo, varios estudios han descrito que el motivo NLS presente en el dominio N-terminal de las lipinas (KKKKRRKK) es necesario para su unión a membranas microsomales(9, 59). Es posible que esta secuencia junto con algún otro motivo especial de la lipina-1 α juegue algún papel en su unión a la superficie de las gotas lipídicas.

Por otro lado, el hecho de que la lipina-1 β no se una a las gotas lipídicas difiriendo en tan sólo 33 aminoácidos extra a la lipina-1 α , hace pensar en la posibilidad de que esos 33 aminoácidos formen un dominio que enmascare de alguna forma el sitio de anclaje a estos orgánulos.

Aunque en macrófagos humanos, la lipina-1 β es mayoritariamente citoplasmática, también la hemos detectado en el núcleo. Estos resultados coinciden con otros estudios realizados en células HEK 293 sobreexpresando lipina-1 β (9). A diferencia de lo descrito en otros sistemas celulares mayormente procedentes de ratón, en macrófagos humanos la lipina-1 α nunca está presente en el núcleo(28, 58), ni siquiera tras tratamiento con Leptomycin B, un potente inhibidor del transporte nuclear(164).

La co-sobreexpresión de quimeras fluorescentes de lipina-1 α y lipina- β , produce el desplazamiento de la lipina-1 β al núcleo en un porcentaje muy alto de células sin afectar a la localización de la lipina-1 α . Esto contrasta con la baja tasa de células que expresan lipina- β de forma nuclear cuando se transfecta sólo la lipina-1 β . Según estos resultados es posible que la lipina-1 α regule la localización de la lipina-1 β en macrófagos humanos, algo que no ha sido descrito con anterioridad en otros sistemas celulares. Desconocemos por el momento el mecanismo por el cual la lipina-1 α podría regular la localización nuclear de la lipina- β .

3. Papel de la lipina-1 en la síntesis de triglicéridos

A pesar de que las lipinas son enzimas clave en la síntesis de TAG y fosfolípidos (166, 167), los experimentos realizados en este trabajo demuestran que en macrófagos humanos la lipina-1 no participa en la síntesis de TAG. El hecho de que la incorporación de ácido oleico sea igual en macrófagos deficientes en lipina-1 que en las células control podría deberse a efectos compensatorios de la lipina-2 o de la lipina-3, como ocurre en el hígado de los ratones *fld*(20).

Estudios realizados en el laboratorio ha demostrado que la lipina-2 parece ser la responsable en la síntesis de TAG en macrófagos (179). En células RAW 264.7, la falta de lipina-2 provoca una disminución de la masa de todas las especies de ácidos grasos que forman parte de los TAG detectadas. Además, en macrófagos humanos también se ha

observado una bajada significativa del contenido total de TAG, tanto en células tratadas con ácidos grasos como en las células sin tratar(179). Estos resultados sugieren que la lipina-1 y la lipina-2 llevan a cabo funciones diferenciadas en el macrófago. Mientras que la lipina-1 no participa en la síntesis de TAG, la lipina-2 parece ser la responsable de esta función en estas células. La contribución de la lipina-3 en esta función no ha sido estudiada.

4. Función de la lipina-1 en las gotas lipídicas

Aunque la lipina-1 no participa en la síntesis de TAG en macrófagos humanos, los resultados obtenidos en este trabajo indican que participa de forma directa en la morfología, distribución y número de las gotas lipídicas en estas células.

Varios estudios han demostrado que las gotas lipídicas son lugares claves para la producción de mediadores proinflamatorios, como los eicosanoides, en las células del sistema inmune innato(134), localizándose en dichos orgánulos las enzimas principales implicadas en la producción de estos compuestos(131, 134)). Así por ejemplo, durante los procesos inflamatorios que cursan con la infección por patógenos, se produce un aumento en la producción de prostanglandina E2, que va correlacionado con un aumento en la producción de gotas lipídicas (142, 143, 144). Puesto que la lipina-1 juega un papel importante en el número y tamaño de las gotas lipídicas en macrófagos humanos y dichos orgánulos participan activamente en inflamación, la lipina-1 podría tener un papel importante durante los procesos inflamatorios modulando las propiedades físicas de estos orgánulos.

Los resultados de espectrometría de masas han demostrado que la composición en los ácidos grasos que forman parte de los TAG de las gotas lipídicas, es diferente en las células deficientes en lipina-1. Además, la incorporación de ácido oleico en el TAG de las gotas lipídicas es menor en células deficientes en lipina-1 que en células control, indicando que la lipina-1 participa en la composición e incorporación de ácidos grasos en el TAG de las gotas lipídicas, sin afectar al contenido total de TAG celular.

En las células COS-7, tanto la expresión de lipina-1 α , como la de lipina-1 γ altera la morfología y distribución de las gotas lipídicas. Mientras que las células que sobreexpresan lipina-1 α predominan gotas lipídicas pequeñas y muy dispersas, las que

sobreexpresan lipina-1 y tienen gotas lipídicas pequeñas y no dispersas (176). Sin embargo, en nuestro estudio la falta de lipina-1 provoca que las gotas lipídicas sean de menor tamaño y que se encuentren más dispersas, lo que sugiere que la función de la lipina-1 sobre la biología de estos orgánulos, podría variar dependiendo del tipo celular estudiado.

Otro estudio realizado en el laboratorio ha mostrado que la falta de lipina-2 en macrófagos humanos provoca una disminución de gotas lipídicas y una disminución en la masa total de TAG (179). Por tanto, la función de la lipina-2 sobre el tamaño de las gotas lipídicas puede deberse fundamentalmente a su participación directa en la biosíntesis de TAG. Estos resultados indican una vez más que la lipina-1 y la lipina-2 llevan a cabo funciones diferentes e incluso complementarias en macrófagos humanos, e indican que cada lipina tiene un papel celular que no puede ser realizado por otros miembros de la familia.

5. La lipina-1 modula la regulación de la cPLA₂α

La idea que la actividad PAP podría participar en la regulación de la disponibilidad celular de AA ha sido objeto de estudio durante muchos años, incluso antes de que se identificaran las lipinas como las responsables de esta actividad. Los inhibidores farmacológicos de la actividad PAP, como el propanonol o el BEL reducen la liberación de AA en células WISH, U937 y RAW 264.7 (75, 77, 180). Las aproximaciones genéticas nos han permitido en este trabajo corroborar los datos obtenidos con el uso de inhibidores y dar un paso más sobre los posibles mecanismos de regulación de la cPLA₂α por las lipinas en macrófagos humanos.

El silenciamiento génico de la lipina-1 por siRNA, produce una bajada significativa de los niveles de AA liberado en macrófagos humanos tratados con ácido oleico y zymosan osonizado, proporcionando una evidencia genética sobre la implicación de la lipina-1 en la modulación de la actividad cPLA₂α. Además, en estas células se produce una menor producción de prostaglandina E₂, aportando un nuevo dato sobre la implicación de la lipina-1 en inflamación. Por otro lado, en macrófagos deficientes en lipina-1 no se produce la fosforilación del residuo Ser⁵⁰⁵ de la cPLA₂α, confirmando la relación existente entre la lipina-1 y la cPLA₂α

La lipina-1 podría regular la cPLA₂α por dos mecanismos diferentes e independientes. En primer lugar, el DAG producido por la lipina-1 podría favorecer la penetración de la cPLA₂α a las membranas biológicas. Se sabe que la actividad de la cPLA₂α se incrementa hasta 5 veces cuando se incorpora DAG en experimentos *in vitro*(181), y que la acumulación de DAG en membranas permite que la cPLA₂α penetre con mayor facilidad a los fosfolípidos de membrana(182). Como la cPLA₂α carece de dominio de unión a DAG, se ha sugerido que el DAG actúa como espaciador para separar las cabezas polares de los fosfolípidos de la membrana, facilitando así la penetración de la cPLA₂α dentro de las mismas(182). Este escenario, estaría reforzado por el hecho de que los macrófagos deficientes en lipina-1 presentan un menor contenido en DAG. En segundo lugar, la lipina-1 podría modular la actividad de la cPLA₂α por la activación de quinasas que influyen de manera directa o indirecta en el estado de fosforilación y activación de la cPLA₂α. Este mecanismo no es excluyente del primero, puesto que ambas rutas podrían converger. Resultados obtenidos en otros laboratorios sugieren este mismo mecanismo de acción para el DAG. Por ejemplo, en la fagocitosis mediada por IgG en monocitos, la activación de PKC dependientes de DAG precede a la liberación de AA(183). Otros estudios sugieren que la actividad PAP participa en la activación de la cPLA₂α vía PKC, probablemente por un efecto indirecto, por ejemplo, mediante la activación de las MAPK (184, 185, 186, 187). En este sentido se ha descrito en nuestro laboratorio que la fosforilación de la cPLA₂α es dependiente de la quinasa JNK en macrófagos humanos(188). En nuestro trabajo no hemos demostrado la implicación de las MAPK en la regulación de la fosforilación de la cPLA₂α por lipinas, pero es una posibilidad que no podemos descartar. Hay en la literatura estudios que demuestran que la activación de JNK es necesaria para la producción de gotas lipídicas mediada por cPLA₂α en células estimuladas con suero(115). Todos estos datos apuntan a JNK como posible vínculo de unión molecular entre la lipina-1 y la cPLA₂α.

6. Función de la cPLA₂α y lipina-1 en biogénesis de las gotas lipídicas

Varios estudios han demostrado la implicación de la cPLA₂α en la producción de gotas lipídicas inducida por suero (113, 115) y en este trabajo se ha demostrado que el silenciamiento de la lipina-1 provoca un cambio en la morfología, número, composición e incorporación de los ácidos grasos que componen los TAG de las gotas lipídicas. Por el contrario, la sobreexpresión de la lipina-1α junto con la cPLA₂α provoca una mayor producción de gotas lipídicas en células HEK293 que la simple sobreexpresión de cPLA₂α

o la sobreexpresión conjunta de lipina-1 β y cPLA2 α . Los datos obtenidos demuestran que la lipina-1 α , y no la lipina-1 β , incrementa la producción de gotas lipídicas. (188, 189)

7. Localización de las lipinas-2 y -3 en macrófagos humanos

Hasta la fecha sólo hay un estudio de localización de lipina-2 por microscopía realizado en células HeLa, donde se describe asociada parcialmente a RE (21). En hígado de ratón, se ha descrito por técnicas de fraccionamiento subcelular que la lipina-2 está mayoritariamente en citosol, y en pequeñas cantidades en gotas lipídicas, RE, y núcleo(20). En nuestro estudio los macrófagos humanos tienen lipina-2 en citoplasma y en la zona nuclear más externa. El análisis de colocalización con marcadores de RE indica que la lipina-2 no está en las membranas de este orgánulo en macrófagos humanos. No parece que el estado de activación celular influya en la localización de esta lipina puesto que las células tratadas con PMA, LPS ó ácido oleico muestran un comportamiento distinto que las células control en este sentido. Por tanto, al igual que ocurre para la lipina-1, la localización de la lipina-2 parece depender del tipo celular, dándonos idea de que las funciones que desempeñe son posiblemente diferentes en cada una de ellas.

En cuanto a la lipina-3, el miembro más desconocido de la familia, su localización en macrófagos humanos es principalmente citoplasmática, aunque también parece acumularse en membrana plasmática. Esta última localización no se ha observado para el resto de lipinas, pareciendo específica para lipina-3.

El estudio descrito en este trabajo es el primero en definir la localización de los cuatro miembros principales de la familia lipina en un mismo tipo celular, macrófagos humanos, demostrando que cada una de ellas presenta un patrón de localización diferente en esas células inmunes.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo se han elaborado las siguientes conclusiones:

1. Durante el proceso de diferenciación macrofágica se produce un aumento de la expresión génica de todas las lipinas, detectándose también un importante aumento en las distintas proteínas (lipina-1, -2 y -3) en los primeros días de diferenciación. Dicho aumento se mantiene a lo largo del proceso.
2. La lipina-1 α está presente en la superficie de las gotas lipídicas de los macrófagos humanos, uniéndose por la cara citosólica de éstos. En estas estructuras colocaliza con otras proteínas que se consideran marcadores de estos orgánulos como la ADRP o el TIP47.
3. La localización de la lipina-1 α en gotas lipídicas no es dependiente de la actividad PAP, ni del estado de activación del macrófago.
4. La lipina-1 β es una proteína citosólica que también aparece en algunas ocasiones en el núcleo. Dicha localización aumenta su frecuencia en células que sobreexpresan lipina-1 α .
5. La lipina-1 endógena del macrófago se encuentra en el citosol y en las gotas lipídicas, por lo que la localización observada con las quimeras de fusión con proteínas fluorescentes no se debe a la sobreexpresión de dichas proteínas.
6. La lipina-1 no está implicada en la síntesis del TAG celular pero si participa en la composición lipídica, tamaño y número de las gotas lipídicas, tanto en macrófagos humanos como en macrófagos peritoneales de ratón.
7. Las células carentes de lipina-1 tienen en las moléculas de TAG de sus gotas lipídicas más ácido mirístico y palmítico, pero menos ácido linoleico.

8. Las células con niveles reducidos de lipina-1 liberan menos AA tras estimulación celular, tanto con estímulos metabólicos como el ácido oléico, como con estímulos inmunes, como el zimosán.
9. La lipina-1 no modifica la cantidad ni las especies de fosfolípidos que contienen AA.
10. La lipina-1 influye en la cantidad y composición de DAG celular. La ausencia de lipina-1 disminuye los niveles de ácido pentadecénico, sapiénico, oleico, araquídico y adrenico en las moléculas de DAG.
11. La lipina-1 regula la actividad y fosforilación de la cPLA₂ α , así como los niveles de prostaglandinas en macrófagos humanos.
12. La lipina-1 α y la cPLA₂ α colaboran sinérgicamente en la generación de gotas lipídicas. La lipina-1 β no puede sustituir a la lipina-1 α en este papel.
13. La lipina-2 es una proteína citoplasmática en macrófagos humanos, pudiendo también encontrarse en la parte más externa del núcleo.
14. La lipina-3 es una proteína citoplasmática y también parece asociarse a la membrana plasmática de los macrófagos.

BIBLIOGRAFÍA

1. KENNEDY, E. P. Synthesis of Phosphatides in Isolated Mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*, Mar, 1953, vol. 201, no. 1. pp. 399-412. ISSN 0021-9258; 0021-9258.
2. KENNEDY, E. P. Biosynthesis of Phospholipides. *Federation Proceedings*, Sep, 1957, vol. 16, no. 3. pp. 847-853. ISSN 0014-9446; 0014-9446.
3. PETERFY, M., et al. Lipodystrophy in the Fld Mouse Results from Mutation of a New Gene Encoding a Nuclear Protein, Lipin. *Nature Genetics*, Jan, 2001, vol. 27, no. 1. pp. 121-124. ISSN 1061-4036; 1061-4036.
4. LANGNER, C. A., et al. The Fatty Liver Dystrophy (Fld) Mutation. A New Mutant Mouse with a Developmental Abnormality in Triglyceride Metabolism and Associated Tissue-Specific Defects in Lipoprotein Lipase and Hepatic Lipase Activities. *The Journal of Biological Chemistry*, May 15, 1989, vol. 264, no. 14. pp. 7994-8003. ISSN 0021-9258; 0021-9258.
5. LANGNER, C. A., et al. Characterization of the Peripheral Neuropathy in Neonatal and Adult Mice that are Homozygous for the Fatty Liver Dystrophy (Fld) Mutation. *The Journal of Biological Chemistry*, Jun 25, 1991, vol. 266, no. 18. pp. 11955-11964. ISSN 0021-9258; 0021-9258.
6. PETERFY, M.; PHAN, J. and REUE, K. Alternatively Spliced Lipin Isoforms Exhibit Distinct Expression Pattern, Subcellular Localization, and Role in Adipogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 20050727, Sep 23, 2005, vol. 280, no. 38. pp. 32883-32889. ISSN 0021-9258; 0021-9258.
7. HAN, G. S.; and CARMAN, G. M. Characterization of the Human LPIN1-Encoded Phosphatidate Phosphatase Isoforms. *The Journal of Biological Chemistry*, 20100315, May 7, 2010, vol. 285, no. 19. pp. 14628-14638. ISSN 1083-351X; 0021-9258.
8. HAN, G. S.; WU, W. I. and CARMAN, G. M. The *Saccharomyces Cerevisiae* Lipin Homolog is a Mg²⁺-Dependent Phosphatidate Phosphatase Enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 20060208, Apr 7, 2006, vol. 281, no. 14. pp. 9210-9218. ISSN 0021-9258; 0021-9258.

- 9.** REN, H., et al. A Phosphatidic Acid binding/nuclear Localization Motif Determines lipin1 Function in Lipid Metabolism and Adipogenesis. *Molecular Biology of the Cell*, 20100721, Sep 15, 2010, vol. 21, no. 18. pp. 3171-3181. ISSN 1939-4586; 1059-1524.
- 10.** FINCK, B. N., et al. Lipin 1 is an Inducible Amplifier of the Hepatic PGC-1alpha/PPARalpha Regulatory Pathway. *Cell Metabolism*, Sep, 2006, vol. 4, no. 3. pp. 199-210. ISSN 1550-4131; 1550-4131.
- 11.** DONKOR, J., et al. Three Mammalian Lipins Act as Phosphatidate Phosphatases with Distinct Tissue Expression Patterns. *The Journal of Biological Chemistry*, 20061207, Feb 9, 2007, vol. 282, no. 6. pp. 3450-3457. ISSN 0021-9258; 0021-9258.
- 12.** CARMAN, G. M.; and HAN, G. S. Roles of Phosphatidate Phosphatase Enzymes in Lipid Metabolism. *Trends in Biochemical Sciences*, 20061031, Dec, 2006, vol. 31, no. 12. pp. 694-699. ISSN 0968-0004; 0968-0004.
- 13.** CASCALES, C.; MANGIAPANE, E. H. and BRINDLEY, D. N. Oleic Acid Promotes the Activation and Translocation of Phosphatidate Phosphohydrolase from the Cytosol to Particulate Fractions of Isolated Rat Hepatocytes. *The Biochemical Journal*, May 1, 1984, vol. 219, no. 3. pp. 911-916. ISSN 0264-6021; 0264-6021.
- 14.** JOHNSTON, J. M., et al. The Utilization of the Alpha-Glycerophosphate and Monoglyceride Pathways for Phosphatidyl Choline Biosynthesis in the Intestine. *Biochimica Et Biophysica Acta*, Oct 6, 1970, vol. 218, no. 1. pp. 124-133. ISSN 0006-3002; 0006-3002.
- 15.** BRINDLEY, D. N.; and PILQUIL, C. Lipid Phosphate Phosphatases and Signaling. *Journal of Lipid Research*, 20081209, Apr, 2009, vol. 50 Suppl. pp. S225-30. ISSN 0022-2275; 0022-2275.
- 16.** KOONIN, E. V.; and TATUSOV, R. L. Computer Analysis of Bacterial Haloacid Dehalogenases Defines a Large Superfamily of Hydrolases with Diverse Specificity. Application of an Iterative Approach to Database Search. *Journal of Molecular Biology*, Nov 18, 1994, vol. 244, no. 1. pp. 125-132. ISSN 0022-2836; 0022-2836.

- 17.** DONKOR, J., et al. A Conserved Serine Residue is Required for the Phosphatidate Phosphatase Activity but Not the Transcriptional Coactivator Functions of Lipin-1 and Lipin-2. *The Journal of Biological Chemistry*, 20090828, Oct 23, 2009, vol. 284, no. 43. pp. 29968-29978. ISSN 1083-351X; 0021-9258.
- 18.** HARRIS, T. E., et al. Insulin Controls Subcellular Localization and Multisite Phosphorylation of the Phosphatidic Acid Phosphatase, Lipin 1. *The Journal of Biological Chemistry*, 20061114, Jan 5, 2007, vol. 282, no. 1. pp. 277-286. ISSN 0021-9258; 0021-9258.
- 19.** NADRA, K., et al. Phosphatidic Acid Mediates Demyelination in Lpin1 Mutant Mice. *Genes & Development*, Jun 15, 2008, vol. 22, no. 12. pp. 1647-1661. ISSN 0890-9369; 0890-9369.
- 20.** GROPLER, M. C., et al. Lipin 2 is a Liver-Enriched Phosphatidate Phosphohydrolase Enzyme that is Dynamically Regulated by Fasting and Obesity in Mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 20090110, Mar 13, 2009, vol. 284, no. 11. pp. 6763-6772. ISSN 0021-9258; 0021-9258.
- 21.** GRIMSEY, N., et al. Temporal and Spatial Regulation of the Phosphatidate Phosphatases Lipin 1 and 2. *The Journal of Biological Chemistry*, 20080811, Oct 24, 2008, vol. 283, no. 43. pp. 29166-29174. ISSN 0021-9258; 0021-9258.
- 22.** REUE, K.; and BRINDLEY, D. N. Thematic Review Series: Glycerolipids. Multiple Roles for lipins/phosphatidate Phosphatase Enzymes in Lipid Metabolism. *Journal of Lipid Research*, 20080912, Dec, 2008, vol. 49, no. 12. pp. 2493-2503. ISSN 0022-2275; 0022-2275.
- 23.** REUE, K. The Lipin Family: Mutations and Metabolism. *Current Opinion in Lipidology*, Jun, 2009, vol. 20, no. 3. pp. 165-170. ISSN 1473-6535; 0957-9672.
- 24.** REUE, K. A Thematic Review Series: Lipid Droplet Storage and Metabolism: From Yeast to Man. *Journal of Lipid Research*, 20110915, Nov, 2011, vol. 52, no. 11. pp. 1865-1868. ISSN 0022-2275; 0022-2275.

- 25.** PHAN, J.; PETERFY, M. and REUE, K. Lipin Expression Preceding Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma is Critical for Adipogenesis in Vivo and in Vitro. *The Journal of Biological Chemistry*, 20040429, Jul 9, 2004, vol. 279, no. 28. pp. 29558-29564. ISSN 0021-9258; 0021-9258.
- 26.** HALL, A. M., et al. Dynamic and Differential Regulation of Proteins that Coat Lipid Droplets in Fatty Liver Dystrophic Mice. *Journal of Lipid Research*, 20090911, Mar, 2010, vol. 51, no. 3. pp. 554-563. ISSN 0022-2275; 0022-2275.
- 27.** KIM, H. B., et al. Lipin 1 Represses NFATc4 Transcriptional Activity in Adipocytes to Inhibit Secretion of Inflammatory Factors. *Molecular and Cellular Biology*, 20100412, Jun, 2010, vol. 30, no. 12. pp. 3126-3139. ISSN 1098-5549; 0270-7306.
- 28.** LIU, G. H.; and GERACE, L. Sumoylation Regulates Nuclear Localization of Lipin-1alpha in Neuronal Cells. *PloS One*, 20090915, Sep 15, 2009, vol. 4, no. 9. pp. e7031. ISSN 1932-6203; 1932-6203.
- 29.** SIROVER, M. A. New Nuclear Functions of the Glycolytic Protein, Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase, in Mammalian Cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, May 1, 2005, vol. 95, no. 1. pp. 45-52. ISSN 0730-2312; 0730-2312.
- 30.** YANG, X.; ZHANG, F. and KUDLOW, J. E. Recruitment of O-GlcNAc Transferase to Promoters by Corepressor mSin3A: Coupling Protein O-GlcNAcylation to Transcriptional Repression. *Cell*, Jul 12, 2002, vol. 110, no. 1. pp. 69-80. ISSN 0092-8674; 0092-8674.
- 31.** PHAN, J.; and REUE, K. Lipin, a Lipodystrophy and Obesity Gene. *Cell Metabolism*, Jan, 2005, vol. 1, no. 1. pp. 73-83. ISSN 1550-4131; 1550-4131.
- 32.** BRINDLEY, D. N., et al. Phosphatidate Degradation: Phosphatidate Phosphatases (Lipins) and Lipid Phosphate Phosphatases. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 20090227, Sep, 2009, vol. 1791, no. 9. pp. 956-961. ISSN 0006-3002; 0006-3002.
- 33.** XU, J., et al. Lipin Deficiency Impairs Diurnal Metabolic Fuel Switching. *Diabetes*, Dec, 2006, vol. 55, no. 12. pp. 3429-3438. ISSN 0012-1797; 0012-1797.

34. REUE, K., et al. Adipose Tissue Deficiency, Glucose Intolerance, and Increased Atherosclerosis Result from Mutation in the Mouse Fatty Liver Dystrophy (Fld) Gene. *Journal of Lipid Research*, Jul, 2000, vol. 41, no. 7. pp. 1067-1076. ISSN 0022-2275; 0022-2275.
35. VAN HARMELEN, V., et al. A Role of Lipin in Human Obesity and Insulin Resistance: Relation to Adipocyte Glucose Transport and GLUT4 Expression. *Journal of Lipid Research*, 20061011, Jan, 2007, vol. 48, no. 1. pp. 201-206. ISSN 0022-2275; 0022-2275.
36. LUSIS, A. J.; ATTIE, A. D. and REUE, K. Metabolic Syndrome: From Epidemiology to Systems Biology. *Nature Reviews Genetics*, Nov, 2008, vol. 9, no. 11. pp. 819-830. ISSN 1471-0064; 1471-0056.
37. CSAKI, L. S.; and REUE, K. Lipins: Multifunctional Lipid Metabolism Proteins. *Annual Review of Nutrition*, Aug 21, 2010, vol. 30. pp. 257-272. ISSN 1545-4312; 0199-9885.
38. RYU, D., et al. TORC2 Regulates Hepatic Insulin Signaling Via a Mammalian Phosphatidic Acid Phosphatase, LIPIN1. *Cell Metabolism*, Mar, 2009, vol. 9, no. 3. pp. 240-251. ISSN 1932-7420; 1550-4131.
39. MANMONTRI, B., et al. Glucocorticoids and Cyclic AMP Selectively Increase Hepatic Lipin-1 Expression, and Insulin Acts Antagonistically. *Journal of Lipid Research*, 20080202, May, 2008, vol. 49, no. 5. pp. 1056-1067. ISSN 0022-2275; 0022-2275.
40. ISHIMOTO, K., et al. Sterol-Mediated Regulation of Human Lipin 1 Gene Expression in Hepatoblastoma Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 20090624, Aug 14, 2009, vol. 284, no. 33. pp. 22195-22205. ISSN 0021-9258; 0021-9258.
41. ZHANG, P., et al. Regulation of Lipin-1 Gene Expression by Glucocorticoids during Adipogenesis. *Journal of Lipid Research*, 20080324, Jul, 2008, vol. 49, no. 7. pp. 1519-1528. ISSN 0022-2275; 0022-2275.
42. SHEN, Z., et al. Involvement of Adiponectin-SIRT1-AMPK Signaling in the Protective Action of Rosiglitazone Against Alcoholic Fatty Liver in Mice. *American Journal of*

Physiology.Gastrointestinal and Liver Physiology, 20091210, Mar, 2010, vol. 298, no. 3. pp. G364-74. ISSN 1522-1547; 0193-1857.

43. LAU, D. C.; and RONCARI, D. A. Effects of Glucocorticoid Hormones on Lipid-Synthetic Enzymes from Different Adipose Tissue Regions and from Liver. *Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology = Revue Canadienne De Biochimie Et Biologie Cellulaire*, Dec, 1983, vol. 61, no. 12. pp. 1245-1250. ISSN 0714-7511; 0714-7511.

44. SIMPSON, K. J., et al. Hepatic Phosphatidate Phosphohydrolase Activity in Acute and Chronic Alcohol-Fed Rats. *Biochemical Society Transactions*, Dec, 1989, vol. 17, no. 6. pp. 1115-1116. ISSN 0300-5127; 0300-5127.

45. BRINDLEY, D. N., et al. The Involvement of Glucocorticoids in Regulating the Activity of Phosphatidate Phosphohydrolase and the Synthesis of Triacylglycerols in the Liver. Effects of Feeding Rats with Glucose, Sorbitol, Fructose, Glycerol and Ethanol. *The Biochemical Journal*, Apr 15, 1979, vol. 180, no. 1. pp. 195-199. ISSN 0264-6021; 0264-6021.

46. BRINDLEY, D. N. Some Aspects of the Physiological and Pharmacological Control of the Synthesis of Triacylglycerols and Phospholipids. *International Journal of Obesity*, 1978, vol. 2, no. 1. pp. 7-16. ISSN 0307-0565; 0307-0565.

47. STURTON, R. G., et al. Effects of Starvation, Corticotropin Injection and Ethanol Feeding on the Activity and Amount of Phosphatidate Phosphohydrolase in Rat Liver. *FEBS Letters*, Apr 20, 1981, vol. 126, no. 2. pp. 297-300. ISSN 0014-5793; 0014-5793.

48. VAVRECKA, M.; MITCHELL, M. P. and HUBSCHER, G. The Effect of Starvation on the Incorporation of Palmitate into Glycerides and Phospholipids of Rat Liver Homogenates. *The Biochemical Journal*, Nov, 1969, vol. 115, no. 2. pp. 139-145. ISSN 0264-6021; 0264-6021.

49. KOH, Y. K., et al. Lipin1 is a Key Factor for the Maturation and Maintenance of Adipocytes in the Regulatory Network with CCAAT/enhancer-Binding Protein Alpha and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma 2. *The Journal of Biological Chemistry*, 20081016, Dec 12, 2008, vol. 283, no. 50. pp. 34896-34906. ISSN 0021-9258; 0021-9258.

50. PEAREN, M. A., et al. The Orphan Nuclear Receptor, NOR-1, a Target of Beta-Adrenergic Signaling, Regulates Gene Expression that Controls Oxidative Metabolism in Skeletal Muscle. *Endocrinology*, 20080306, Jun, 2008, vol. 149, no. 6. pp. 2853-2865. ISSN 0013-7227; 0013-7227.

51. HIGASHIDA, K.; HIGUCHI, M. and TERADA, S. Potential Role of Lipin-1 in Exercise-Induced Mitochondrial Biogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 20080724, Sep 26, 2008, vol. 374, no. 3. pp. 587-591. ISSN 1090-2104; 0006-291X.

52. PHAN, J.; PETERFY, M. and REUE, K. Biphasic Expression of Lipin Suggests Dual Roles in Adipocyte Development. *Drug News & Perspectives*, Jan-Feb, 2005, vol. 18, no. 1. pp. 5-11. ISSN 0214-0934; 0214-0934.

53. GOWRI, P. M., et al. Lipin1 Regulation by Estrogen in Uterus and Liver: Implications for Diabetes and Fertility. *Endocrinology*, 20070426, Aug, 2007, vol. 148, no. 8. pp. 3685-3693. ISSN 0013-7227; 0013-7227.

54. LU, B., et al. LPS and Proinflammatory Cytokines Decrease Lipin-1 in Mouse Adipose Tissue and 3T3-L1 Adipocytes. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 20081021, Dec, 2008, vol. 295, no. 6. pp. E1502-9. ISSN 0193-1849; 0193-1849.

55. TSUCHIYA, Y., et al. A Jak2 Inhibitor, AG490, Reverses Lipin-1 Suppression by TNF-Alpha in 3T3-L1 Adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 20090310, May 1, 2009, vol. 382, no. 2. pp. 348-352. ISSN 1090-2104; 0006-291X.

56. HUFFMAN, T. A.; MOTHE-SATNEY, I. and LAWRENCE, J. C., Jr. Insulin-Stimulated Phosphorylation of Lipin Mediated by the Mammalian Target of Rapamycin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 20020115, Jan 22, 2002, vol. 99, no. 2. pp. 1047-1052. ISSN 0027-8424; 0027-8424.

57. KIM, Y., et al. A Conserved Phosphatase Cascade that Regulates Nuclear Membrane Biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 20070409, Apr 17, 2007, vol. 104, no. 16. pp. 6596-6601. ISSN 0027-8424; 0027-8424.

- 58.** PETERFY, M., et al. Insulin-Stimulated Interaction with 14-3-3 Promotes Cytoplasmic Localization of Lipin-1 in Adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 20091202, Feb 5, 2010, vol. 285, no. 6. pp. 3857-3864. ISSN 1083-351X; 0021-9258.
- 59.** BOU KHALIL, M., et al. The Level and Compartmentalization of Phosphatidate Phosphatase-1 (Lipin-1) Control the Assembly and Secretion of Hepatic VLDL. *Journal of Lipid Research*, 20080903, Jan, 2009, vol. 50, no. 1. pp. 47-58. ISSN 0022-2275; 0022-2275.
- 60.** LIU, G. H., et al. Lipin Proteins Form Homo- and Hetero-Oligomers. *The Biochemical Journal*, Nov 15, 2010, vol. 432, no. 1. pp. 65-76. ISSN 1470-8728; 0264-6021.
- 61.** CHENG, D., et al. Human Acyl-CoA:Diacylglycerol Acyltransferase is a Tetrameric Protein. *The Biochemical Journal*, Nov 1, 2001, vol. 359, no. Pt 3. pp. 707-714. ISSN 0264-6021; 0264-6021.
- 62.** ZEHARIA, A., et al. Mutations in LPIN1 Cause Recurrent Acute Myoglobinuria in Childhood. *American Journal of Human Genetics*, 20080925, Oct, 2008, vol. 83, no. 4. pp. 489-494. ISSN 1537-6605; 0002-9297.
- 63.** LINDEGAARD, B., et al. Adipose Tissue Lipin Expression Levels Distinguish HIV Patients with and without Lipodystrophy. *International Journal of Obesity (2005)*, 20060718, Mar, 2007, vol. 31, no. 3. pp. 449-456. ISSN 0307-0565; 0307-0565.
- 64.** CROCE, M. A., et al. Hepatic Lipin 1beta Expression is Diminished in Insulin-Resistant Obese Subjects and is Reactivated by Marked Weight Loss. *Diabetes*, 20070611, Sep, 2007, vol. 56, no. 9. pp. 2395-2399. ISSN 1939-327X; 0012-1797.
- 65.** MLINAR, B., et al. Decreased Lipin 1 Beta Expression in Visceral Adipose Tissue is Associated with Insulin Resistance in Polycystic Ovary Syndrome. *European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, 20081001, Dec, 2008, vol. 159, no. 6. pp. 833-839. ISSN 1479-683X; 0804-4643.
- 66.** FAWCETT, K. A., et al. Evaluating the Role of LPIN1 Variation in Insulin Resistance, Body Weight, and Human Lipodystrophy in U.K. Populations. *Diabetes*, 20080630, Sep, 2008, vol. 57, no. 9. pp. 2527-2533. ISSN 1939-327X; 0012-1797.

- 67.** LOOS, R. J., et al. Association of Lipin 1 Gene Polymorphisms with Measures of Energy and Glucose Metabolism. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, Nov, 2007, vol. 15, no. 11. pp. 2723-2732. ISSN 1930-7381; 1930-7381.
- 68.** WIEDMANN, S., et al. Genetic Variants within the LPIN1 Gene, Encoding Lipin, are Influencing Phenotypes of the Metabolic Syndrome in Humans. *Diabetes*, 20071016, Jan, 2008, vol. 57, no. 1. pp. 209-217. ISSN 1939-327X; 0012-1797.
- 69.** KANG, E. S., et al. LPIN1 Genetic Variation is Associated with Rosiglitazone Response in Type 2 Diabetic Patients. *Molecular Genetics and Metabolism*, 20080809, Sep-Oct, 2008, vol. 95, no. 1-2. pp. 96-100. ISSN 1096-7206; 1096-7192.
- 70.** AL-MOSAWI, Z. S., et al. A Splice Site Mutation Confirms the Role of LPIN2 in Majeed Syndrome. *Arthritis and Rheumatism*, Mar, 2007, vol. 56, no. 3. pp. 960-964. ISSN 0004-3591; 0004-3591.
- 71.** FERGUSON, P. J., et al. Homozygous Mutations in LPIN2 are Responsible for the Syndrome of Chronic Recurrent Multifocal Osteomyelitis and Congenital Dyserythropoietic Anaemia (Majeed Syndrome). *Journal of Medical Genetics*, Jul, 2005, vol. 42, no. 7. pp. 551-557. ISSN 1468-6244; 0022-2593.
- 72.** MAJEED, H. A., et al. The Syndrome of Chronic Recurrent Multifocal Osteomyelitis and Congenital Dyserythropoietic Anaemia. Report of a New Family and a Review. *European Journal of Pediatrics*, Dec, 2001, vol. 160, no. 12. pp. 705-710. ISSN 0340-6199; 0340-6199.
- 73.** MILHAVET, F., et al. The Infevers Autoinflammatory Mutation Online Registry: Update with New Genes and Functions. *Human Mutation*, Jun, 2008, vol. 29, no. 6. pp. 803-808. ISSN 1098-1004; 1059-7794.
- 74.** AULCHENKO, Y. S., et al. LPIN2 is Associated with Type 2 Diabetes, Glucose Metabolism, and Body Composition. *Diabetes*, 20070905, Dec, 2007, vol. 56, no. 12. pp. 3020-3026. ISSN 1939-327X; 0012-1797.

- 75.** BALBOA, M. A.; BALSINDE, J. and DENNIS, E. A. Involvement of Phosphatidate Phosphohydrolase in Arachidonic Acid Mobilization in Human Amnionic WISH Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, Mar 27, 1998, vol. 273, no. 13. pp. 7684-7690. ISSN 0021-9258; 0021-9258.
- 76.** JOHNSON, C. A., et al. Regulation of Cyclooxygenase-2 Expression by Phosphatidate Phosphohydrolase in Human Amnionic WISH Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, Sep 24, 1999, vol. 274, no. 39. pp. 27689-27693. ISSN 0021-9258; 0021-9258.
- 77.** GRKOVICH, A., et al. Lipopolysaccharide-Induced Cyclooxygenase-2 Expression in Human U937 Macrophages is Phosphatidic Acid Phosphohydrolase-1-Dependent. *The Journal of Biological Chemistry*, 20060831, Nov 3, 2006, vol. 281, no. 44. pp. 32978-32987. ISSN 0021-9258; 0021-9258.
- 78.** FUENTES, L., et al. Bromoenol Lactone Promotes Cell Death by a Mechanism Involving Phosphatidate Phosphohydrolase-1 rather than Calcium-Independent Phospholipase A2. *The Journal of Biological Chemistry*, 20030902, Nov 7, 2003, vol. 278, no. 45. pp. 44683-44690. ISSN 0021-9258; 0021-9258.
- 79.** MURPHY, D. J. The Biogenesis and Functions of Lipid Bodies in Animals, Plants and Microorganisms. *Progress in Lipid Research*, Sep, 2001, vol. 40, no. 5. pp. 325-438. ISSN 0163-7827; 0163-7827.
- 80.** TAUCHI-SATO, K., et al. The Surface of Lipid Droplets is a Phospholipid Monolayer with a Unique Fatty Acid Composition. *The Journal of Biological Chemistry*, 20020906, Nov 15, 2002, vol. 277, no. 46. pp. 44507-44512. ISSN 0021-9258; 0021-9258.
- 81.** SUZUKI, M., et al. Lipid Droplets: Size Matters. *Journal of Electron Microscopy*, 2011, vol. 60 Suppl 1. pp. S101-16. ISSN 1477-9986; 0022-0744.
- 82.** WALTHER, T. C.; and FARESE, R. V., Jr. The Life of Lipid Droplets. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 20081107, Jun, 2009, vol. 1791, no. 6. pp. 459-466. ISSN 0006-3002; 0006-3002.

- 83.** GUO, Y., et al. Functional Genomic Screen Reveals Genes Involved in Lipid-Droplet Formation and Utilization. *Nature*, 20080413, May 29, 2008, vol. 453, no. 7195. pp. 657-661. ISSN 1476-4687; 0028-0836.
- 84.** KUERSCHNER, L.; MOESSINGER, C. and THIELE, C. Imaging of Lipid Biosynthesis: How a Neutral Lipid Enters Lipid Droplets. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 20071211, Mar, 2008, vol. 9, no. 3. pp. 338-352. ISSN 1398-9219; 1398-9219.
- 85.** STONE, S. J., et al. The Endoplasmic Reticulum Enzyme DGAT2 is found in Mitochondria-Associated Membranes and has a Mitochondrial Targeting Signal that Promotes its Association with Mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*, 20081201, Feb 20, 2009, vol. 284, no. 8. pp. 5352-5361. ISSN 0021-9258; 0021-9258.
- 86.** POL, A., et al. A Caveolin Dominant Negative Mutant Associates with Lipid Bodies and Induces Intracellular Cholesterol Imbalance. *The Journal of Cell Biology*, Mar 5, 2001, vol. 152, no. 5. pp. 1057-1070. ISSN 0021-9525; 0021-9525.
- 87.** BOSTROM, P., et al. SNARE Proteins Mediate Fusion between Cytosolic Lipid Droplets and are Implicated in Insulin Sensitivity. *Nature Cell Biology*, 20071007, Nov, 2007, vol. 9, no. 11. pp. 1286-1293. ISSN 1465-7392; 1465-7392.
- 88.** MIURA, S., et al. Functional Conservation for Lipid Storage Droplet Association among Perilipin, ADRP, and TIP47 (PAT)-Related Proteins in Mammals, Drosophila, and Dictyostelium. *The Journal of Biological Chemistry*, 20020620, Aug 30, 2002, vol. 277, no. 35. pp. 32253-32257. ISSN 0021-9258; 0021-9258.
- 89.** BRASAEMLE, D. L. Thematic Review Series: Adipocyte Biology. the Perilipin Family of Structural Lipid Droplet Proteins: Stabilization of Lipid Droplets and Control of Lipolysis. *Journal of Lipid Research*, 20070918, Dec, 2007, vol. 48, no. 12. pp. 2547-2559. ISSN 0022-2275; 0022-2275.
- 90.** HICKENBOTTOM, S. J., et al. Structure of a Lipid Droplet Protein; the PAT Family Member TIP47. *Structure (London, England : 1993)*, Jul, 2004, vol. 12, no. 7. pp. 1199-1207. ISSN 0969-2126; 0969-2126.

- 91.** WOLINS, N. E., et al. S3-12, Adipophilin, and TIP47 Package Lipid in Adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 20050224, May 13, 2005, vol. 280, no. 19. pp. 19146-19155. ISSN 0021-9258; 0021-9258.
- 92.** LONDOS, C., et al. Role of PAT Proteins in Lipid Metabolism. *Biochimie*, Jan, 2005, vol. 87, no. 1. pp. 45-49. ISSN 0300-9084; 0300-9084.
- 93.** SZTALRYD, C., et al. Perilipin A is Essential for the Translocation of Hormone-Sensitive Lipase during Lipolytic Activation. *The Journal of Cell Biology*, 20030616, Jun 23, 2003, vol. 161, no. 6. pp. 1093-1103. ISSN 0021-9525; 0021-9525.
- 94.** BRASAEMLE, D. L., et al. Adipose Differentiation-Related Protein is an Ubiquitously Expressed Lipid Storage Droplet-Associated Protein. *Journal of Lipid Research*, Nov, 1997, vol. 38, no. 11. pp. 2249-2263. ISSN 0022-2275; 0022-2275.
- 95.** HEID, H. W., et al. Adipophilin is a Specific Marker of Lipid Accumulation in Diverse Cell Types and Diseases. *Cell and Tissue Research*, Nov, 1998, vol. 294, no. 2. pp. 309-321. ISSN 0302-766X; 0302-766X.
- 96.** IMAMURA, M., et al. ADRP Stimulates Lipid Accumulation and Lipid Droplet Formation in Murine Fibroblasts. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, Oct, 2002, vol. 283, no. 4. pp. E775-83. ISSN 0193-1849; 0193-1849.
- 97.** FUJIMOTO, T., et al. Lipid Droplets: A Classic Organelle with New Outfits. *Histochemistry and Cell Biology*, 20080611, Aug, 2008, vol. 130, no. 2. pp. 263-279. ISSN 0948-6143; 0948-6143.
- 98.** DIAZ, E.; and PFEFFER, S. R. TIP47: A Cargo Selection Device for Mannose 6-Phosphate Receptor Trafficking. *Cell*, May 1, 1998, vol. 93, no. 3. pp. 433-443. ISSN 0092-8674; 0092-8674.
- 99.** KRISE, J. P., et al. Quantitative Analysis of TIP47-Receptor Cytoplasmic Domain Interactions: Implications for Endosome-to-Trans Golgi Network Trafficking. *The Journal of Biological Chemistry*, Aug 18, 2000, vol. 275, no. 33. pp. 25188-25193. ISSN 0021-9258; 0021-9258.

- 100.** WOLINS, N. E., et al. OXPAT/PAT-1 is a PPAR-Induced Lipid Droplet Protein that Promotes Fatty Acid Utilization. *Diabetes*, Dec, 2006, vol. 55, no. 12. pp. 3418-3428. ISSN 0012-1797; 0012-1797.
- 101.** MURPHY, D. J.; and VANCE, J. Mechanisms of Lipid-Body Formation. *Trends in Biochemical Sciences*, Mar, 1999, vol. 24, no. 3. pp. 109-115. ISSN 0968-0004; 0968-0004.
- 102.** ROBENEK, M. J., et al. Lipids Partition Caveolin-1 from ER Membranes into Lipid Droplets: Updating the Model of Lipid Droplet Biogenesis. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20040304, May, 2004, vol. 18, no. 7. pp. 866-868. ISSN 1530-6860; 0892-6638.
- 103.** PLOEGH, H. L. A Lipid-Based Model for the Creation of an Escape Hatch from the Endoplasmic Reticulum. *Nature*, Jul 26, 2007, vol. 448, no. 7152. pp. 435-438. ISSN 1476-4687; 0028-0836.
- 104.** ROBENEK, H.; ROBENEK, M. J. and TROYER, D. PAT Family Proteins Pervade Lipid Droplet Cores. *Journal of Lipid Research*, 20050301, Jun, 2005, vol. 46, no. 6. pp. 1331-1338. ISSN 0022-2275; 0022-2275.
- 105.** ROBENEK, H., et al. Adipophilin-Enriched Domains in the ER Membrane are Sites of Lipid Droplet Biogenesis. *Journal of Cell Science*, 20060919, Oct 15, 2006, vol. 119, no. Pt 20. pp. 4215-4224. ISSN 0021-9533; 0021-9533.
- 106.** MARTIN, S.; and PARTON, R. G. Lipid Droplets: A Unified View of a Dynamic Organelle. *Nature Reviews.Molecular Cell Biology*, May, 2006, vol. 7, no. 5. pp. 373-378. ISSN 1471-0072; 1471-0072.
- 107.** VOCK, R., et al. Design of the Oxygen and Substrate Pathways. VI. Structural Basis of Intracellular Substrate Supply to Mitochondria in Muscle Cells. *The Journal of Experimental Biology*, Aug, 1996, vol. 199, no. Pt 8. pp. 1689-1697. ISSN 0022-0949; 0022-0949.
- 108.** GOODMAN, J. M. The Gregarious Lipid Droplet. *The Journal of Biological Chemistry*, 20080708, Oct 17, 2008, vol. 283, no. 42. pp. 28005-28009. ISSN 0021-9258; 0021-9258.

- 109.** LIU, P., et al. Rab-Regulated Interaction of Early Endosomes with Lipid Droplets. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 20070222, Jun, 2007, vol. 1773, no. 6. pp. 784-793. ISSN 0006-3002; 0006-3002.
- 110.** BOZZA, P. T., et al. Leukocyte Lipid Body Formation and Eicosanoid Generation: Cyclooxygenase-Independent Inhibition by Aspirin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Oct 1, 1996, vol. 93, no. 20. pp. 11091-11096. ISSN 0027-8424; 0027-8424.
- 111.** DI VITO, M., et al. ¹H NMR-Visible Mobile Lipid Domains Correlate with Cytoplasmic Lipid Bodies in Apoptotic T-Lymphoblastoid Cells. *Biochimica Et Biophysica Acta*, Jan 15, 2001, vol. 1530, no. 1. pp. 47-66. ISSN 0006-3002; 0006-3002.
- 112.** BARBA, I.; CABANAS, M. E. and ARUS, C. The Relationship between Nuclear Magnetic Resonance-Visible Lipids, Lipid Droplets, and Cell Proliferation in Cultured C6 Cells. *Cancer Research*, Apr 15, 1999, vol. 59, no. 8. pp. 1861-1868. ISSN 0008-5472; 0008-5472.
- 113.** GUBERN, A., et al. Group IVA Phospholipase A2 is Necessary for the Biogenesis of Lipid Droplets. *The Journal of Biological Chemistry*, 20080716, Oct 10, 2008, vol. 283, no. 41. pp. 27369-27382. ISSN 0021-9258; 0021-9258.
- 114.** GUBERN, A., et al. Lipid Droplet Biogenesis Induced by Stress Involves Triacylglycerol Synthesis that Depends on Group VIA Phospholipase A2. *The Journal of Biological Chemistry*, 20081230, Feb 27, 2009, vol. 284, no. 9. pp. 5697-5708. ISSN 0021-9258; 0021-9258.
- 115.** GUBERN, A., et al. JNK and Ceramide Kinase Govern the Biogenesis of Lipid Droplets through Activation of Group IVA Phospholipase A2. *The Journal of Biological Chemistry*, 20090924, Nov 20, 2009, vol. 284, no. 47. pp. 32359-32369. ISSN 1083-351X; 0021-9258.
- 116.** SCHALOSKE, R. H.; and DENNIS, E. A. The Phospholipase A2 Superfamily and its Group Numbering System. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 20060803, Nov, 2006, vol. 1761, no. 11. pp. 1246-1259. ISSN 0006-3002; 0006-3002.

- 117.** MURAKAMI, M., et al. Recent Progress in Phospholipase A Research: From Cells to Animals to Humans. *Progress in Lipid Research*, 20101224, Apr, 2011, vol. 50, no. 2. pp. 152-192. ISSN 1873-2194; 0163-7827.
- 118.** CLARK, J. D., et al. A Novel Arachidonic Acid-Selective Cytosolic PLA2 Contains a Ca(2+)-Dependent Translocation Domain with Homology to PKC and GAP. *Cell*, Jun 14, 1991, vol. 65, no. 6. pp. 1043-1051. ISSN 0092-8674; 0092-8674.
- 119.** LESLIE, C. C. Regulation of the Specific Release of Arachidonic Acid by Cytosolic Phospholipase A2. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, Apr, 2004, vol. 70, no. 4. pp. 373-376. ISSN 0952-3278; 0952-3278.
- 120.** ACKERMANN, E. J.; KEMPNER, E. S. and DENNIS, E. A. Ca(2+)-Independent Cytosolic Phospholipase A2 from Macrophage-Like P388D1 Cells. Isolation and Characterization. *The Journal of Biological Chemistry*, Mar 25, 1994, vol. 269, no. 12. pp. 9227-9233. ISSN 0021-9258; 0021-9258.
- 121.** BALSINDE, J., et al. Regulation and Inhibition of Phospholipase A2. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 1999, vol. 39. pp. 175-189. ISSN 0362-1642; 0362-1642.
- 122.** SENO, K., et al. Pyrrolidine Inhibitors of Human Cytosolic Phospholipase A(2). *Journal of Medicinal Chemistry*, Mar 23, 2000, vol. 43, no. 6. pp. 1041-1044. ISSN 0022-2623; 0022-2623.
- 123.** LEHNER, R.; CUI, Z. and VANCE, D. E. Subcellular Localization, Developmental Expression and Characterization of a Liver Triacylglycerol Hydrolase. *The Biochemical Journal*, Mar 15, 1999, vol. 338 (Pt 3), no. Pt 3. pp. 761-768. ISSN 0264-6021; 0264-6021.
- 124.** BLANER, W. S., et al. Hepatic Stellate Cell Lipid Droplets: A Specialized Lipid Droplet for Retinoid Storage. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 20081124, Jun, 2009, vol. 1791, no. 6. pp. 467-473. ISSN 0006-3002; 0006-3002.
- 125.** HEID, H. W.; and KEENAN, T. W. Intracellular Origin and Secretion of Milk Fat Globules. *European Journal of Cell Biology*, Mar, 2005, vol. 84, no. 2-3. pp. 245-258. ISSN 0171-9335; 0171-9335.

- 126.** HAEMMERLE, G., et al. ATGL-Mediated Fat Catabolism Regulates Cardiac Mitochondrial Function Via PPAR-Alpha and PGC-1. *Nature Medicine*, 20110821, Aug 21, 2011, vol. 17, no. 9. pp. 1076-1085. ISSN 1546-170X; 1078-8956.
- 127.** WELTE, M. A. Proteins Under New Management: Lipid Droplets Deliver. *Trends in Cell Biology*, 20070904, Aug, 2007, vol. 17, no. 8. pp. 363-369. ISSN 1879-3088; 0962-8924.
- 128.** OHSAKI, Y., et al. Cytoplasmic Lipid Droplets are Sites of Convergence of Proteasomal and Autophagic Degradation of Apolipoprotein B. *Molecular Biology of the Cell*, 20060405, Jun, 2006, vol. 17, no. 6. pp. 2674-2683. ISSN 1059-1524; 1059-1524.
- 129.** UNGER, R. H.; and SCHERER, P. E. Gluttony, Sloth and the Metabolic Syndrome: A Roadmap to Lipotoxicity. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 20100310, Jun, 2010, vol. 21, no. 6. pp. 345-352. ISSN 1879-3061; 1043-2760.
- 130.** HERKER, E.; and OTT, M. Emerging Role of Lipid Droplets in host/pathogen Interactions. *The Journal of Biological Chemistry*, 20111116, Jan 20, 2012, vol. 287, no. 4. pp. 2280-2287. ISSN 1083-351X; 0021-9258.
- 131.** BOZZA, P. T., et al. Lipid Body Function in Eicosanoid Synthesis: An Update. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, 20110512, Nov, 2011, vol. 85, no. 5. pp. 205-213. ISSN 1532-2823; 0952-3278.
- 132.** YU, W., et al. Co-Compartmentalization of MAP Kinases and Cytosolic Phospholipase A2 at Cytoplasmic Arachidonate-Rich Lipid Bodies. *The American Journal of Pathology*, Mar, 1998, vol. 152, no. 3. pp. 759-769. ISSN 0002-9440; 0002-9440.
- 133.** WOOTEN, R. E., et al. Novel Translocation Responses of Cytosolic Phospholipase A2alpha Fluorescent Proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 20080321, Aug, 2008, vol. 1783, no. 8. pp. 1544-1550. ISSN 0006-3002; 0006-3002.
- 134.** MELO, R. C., et al. Lipid Bodies in Inflammatory Cells: Structure, Function, and Current Imaging Techniques. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official*

Journal of the Histochemistry Society, 20110323, May, 2011, vol. 59, no. 5. pp. 540-556. ISSN 1551-5044; 0022-1554.

135. SMITH, W. L.; DEWITT, D. L. and GARAVITO, R. M. Cyclooxygenases: Structural, Cellular, and Molecular Biology. *Annual Review of Biochemistry*, 2000, vol. 69. pp. 145-182. ISSN 0066-4154; 0066-4154.

136. BOZZA, P. T., et al. Eosinophil Lipid Bodies: Specific, Inducible Intracellular Sites for Enhanced Eicosanoid Formation. *The Journal of Experimental Medicine*, Sep 15, 1997, vol. 186, no. 6. pp. 909-920. ISSN 0022-1007; 0022-1007.

137. THORE, C. R.; BEASLEY, T. C. and BUSIJA, D. W. In Vitro and in Vivo Localization of Prostaglandin H Synthase in Fetal Sheep Neurons. *Neuroscience Letters*, Feb 6, 1998, vol. 242, no. 1. pp. 29-32. ISSN 0304-3940; 0304-3940.

138. BANDEIRA-MELO, C.; PHOOFOLO, M. and WELLER, P. F. Extranuclear Lipid Bodies, Elicited by CCR3-Mediated Signaling Pathways, are the Sites of Chemokine-Enhanced Leukotriene C4 Production in Eosinophils and Basophils. *The Journal of Biological Chemistry*, 20010326, Jun 22, 2001, vol. 276, no. 25. pp. 22779-22787. ISSN 0021-9258; 0021-9258.

139. PACHECO, P., et al. Lipopolysaccharide-Induced Leukocyte Lipid Body Formation in Vivo: Innate Immunity Elicited Intracellular Loci Involved in Eicosanoid Metabolism. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, Dec 1, 2002, vol. 169, no. 11. pp. 6498-6506. ISSN 0022-1767; 0022-1767.

140. PACHECO, P., et al. Monocyte Chemoattractant Protein-1/CC Chemokine Ligand 2 Controls Microtubule-Driven Biogenesis and Leukotriene B4-Synthesizing Function of Macrophage Lipid Bodies Elicited by Innate Immune Response. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, Dec 15, 2007, vol. 179, no. 12. pp. 8500-8508. ISSN 0022-1767; 0022-1767.

141. SILVA, A. R., et al. Lipid Bodies in Oxidized LDL-Induced Foam Cells are Leukotriene-Synthesizing Organelles: A MCP-1/CCL2 Regulated Phenomenon. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 20090630, Nov, 2009, vol. 1791, no. 11. pp. 1066-1075. ISSN 0006-3002; 0006-3002.

- 142.** MELO, R. C., et al. Macrophage Lipid Body Induction by Chagas Disease in Vivo: Putative Intracellular Domains for Eicosanoid Formation during Infection. *Tissue & Cell*, Feb, 2003, vol. 35, no. 1. pp. 59-67. ISSN 0040-8166; 0040-8166.
- 143.** D'AVILA, H., et al. Mycobacterium Bovis Bacillus Calmette-Guerin Induces TLR2-Mediated Formation of Lipid Bodies: Intracellular Domains for Eicosanoid Synthesis in Vivo. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, Mar 1, 2006, vol. 176, no. 5. pp. 3087-3097. ISSN 0022-1767; 0022-1767.
- 144.** RANGEL MORENO, J., et al. The Role of Prostaglandin E2 in the Immunopathogenesis of Experimental Pulmonary Tuberculosis. *Immunology*, Jun, 2002, vol. 106, no. 2. pp. 257-266. ISSN 0019-2805; 0019-2805.
- 145.** BALSINDE, J., et al. Pathways for Arachidonic Acid Mobilization in Zymosan-Stimulated Mouse Peritoneal Macrophages. *Biochimica Et Biophysica Acta*, Jul 22, 1992, vol. 1136, no. 1. pp. 75-82. ISSN 0006-3002; 0006-3002.
- 146.** DIEZ, E., et al. Ethanol Induces Release of Arachidonic Acid but Not Synthesis of Eicosanoids in Mouse Peritoneal Macrophages. *Biochimica Et Biophysica Acta*, Sep 4, 1987, vol. 921, no. 1. pp. 82-89. ISSN 0006-3002; 0006-3002.
- 147.** FERNANDEZ, N., et al. Mannose-Containing Molecular Patterns are Strong Inducers of Cyclooxygenase-2 Expression and Prostaglandin E2 Production in Human Macrophages. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, Jun 15, 2005, vol. 174, no. 12. pp. 8154-8162. ISSN 0022-1767; 0022-1767.
- 148.** LIVAK, K. J.; and SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, Dec, 2001, vol. 25, no. 4. pp. 402-408. ISSN 1046-2023; 1046-2023.
- 149.** SMITH, P. K., et al. Measurement of Protein using Bicinchoninic Acid. *Analytical Biochemistry*, Oct, 1985, vol. 150, no. 1. pp. 76-85. ISSN 0003-2697; 0003-2697.

150. LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, Aug 15, 1970, vol. 227, no. 5259. pp. 680-685. ISSN 0028-0836; 0028-0836.

151. OSTERMEYER, A. G., et al. Role of the Hydrophobic Domain in Targeting Caveolin-1 to Lipid Droplets. *The Journal of Cell Biology*, Jan 5, 2004, vol. 164, no. 1. pp. 69-78. ISSN 0021-9525; 0021-9525.

152. BALBOA, M. A., et al. Localization of Group V Phospholipase A2 in Caveolin-Enriched Granules in Activated P388D1 Macrophage-Like Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 20030908, Nov 28, 2003, vol. 278, no. 48. pp. 48059-48065. ISSN 0021-9258; 0021-9258.

153. LORENZ, H., et al. The Fluorescence Protease Protection (FPP) Assay to Determine Protein Localization and Membrane Topology. *Nature Protocols*, 2006, vol. 1, no. 1. pp. 276-279. ISSN 1750-2799; 1750-2799.

154. WUNDER, C.; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. and LORENZ, H. Determining Membrane Protein Topologies in Single Cells and High-Throughput Screening Applications. *Current Protocols in Cell Biology / Editorial Board, Juan S. Bonifacino ...[Et Al.]*, Dec, 2010, vol. Chapter 5. pp. Unit 5.7. ISSN 1934-2616; 1934-2616.

155. RAMIREZ-ZACARIAS, J. L.; CASTRO-MUNOZLEDO, F. and KURI-HARCUCH, W. Quantitation of Adipose Conversion and Triglycerides by Staining Intracytoplasmic Lipids with Oil Red O. *Histochemistry*, Jul, 1992, vol. 97, no. 6. pp. 493-497. ISSN 0301-5564; 0301-5564.

156. BALBOA, M. A.; SAEZ, Y. and BALSINDE, J. Calcium-Independent Phospholipase A2 is Required for Lysozyme Secretion in U937 Promonocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, May 15, 2003, vol. 170, no. 10. pp. 5276-5280. ISSN 0022-1767; 0022-1767.

157. CASAS, J., et al. Overexpression of Cytosolic Group IVA Phospholipase A2 Protects Cells from Ca²⁺-Dependent Death. *The Journal of Biological Chemistry*, 20051231, Mar 3, 2006, vol. 281, no. 9. pp. 6106-6116. ISSN 0021-9258; 0021-9258.

158. CASAS, J., et al. Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Anchors Cytosolic Group IVA Phospholipase A2 to Perinuclear Membranes and Decreases its Calcium Requirement for Translocation in Live Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 20051012, Jan, 2006, vol. 17, no. 1. pp. 155-162. ISSN 1059-1524; 1059-1524.
159. BLIGH, E. G.; and DYER, W. J. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, Aug, 1959, vol. 37, no. 8. pp. 911-917.
160. ABU, E. O.; and OLUWATOWOJU, I. Omega-3 Index Determined by Gas Chromatography with Electron Impact Mass Spectrometry. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, 20090418, Apr, 2009, vol. 80, no. 4. pp. 189-194. ISSN 1532-2823; 0952-3278.
161. THURNHOFER, S.; and VETTER, W. A Gas chromatography/electron Ionization-Mass Spectrometry-Selected Ion Monitoring Method for Determining the Fatty Acid Pattern in Food After Formation of Fatty Acid Methyl Esters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Nov 16, 2005, vol. 53, no. 23. pp. 8896-8903. ISSN 0021-8561; 0021-8561.
162. BALGOMA, D., et al. Markers of Monocyte Activation Revealed by Lipidomic Profiling of Arachidonic Acid-Containing Phospholipids. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 20100224, Apr 1, 2010, vol. 184, no. 7. pp. 3857-3865. ISSN 1550-6606; 0022-1767.
163. BALGOMA, D., et al. Calcium-Independent Phospholipase A2-Mediated Formation of 1,2-Diarachidonoyl-Glycerophosphoinositol in Monocytes. *The FEBS Journal*, 20081105, Dec, 2008, vol. 275, no. 24. pp. 6180-6191. ISSN 1742-4658; 1742-464X.
164. KUDO, N., et al. Leptomycin B Inactivates CRM1/exportin 1 by Covalent Modification at a Cysteine Residue in the Central Conserved Region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Aug 3, 1999, vol. 96, no. 16. pp. 9112-9117. ISSN 0027-8424; 0027-8424.
165. BALSINDE, J.; FERNANDEZ, B. and DIEZ, E. Regulation of Arachidonic Acid Release in Mouse Peritoneal Macrophages. the Role of Extracellular Calcium and Protein Kinase C.

Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950), Jun 1, 1990, vol. 144, no. 11. pp. 4298-4304. ISSN 0022-1767; 0022-1767.

166. SMITH, S. W.; WEISS, S. B. and KENNEDY, E. P. The Enzymatic Dephosphorylation of Phosphatidic Acids. *The Journal of Biological Chemistry*, Oct, 1957, vol. 228, no. 2. pp. 915-922. ISSN 0021-9258; 0021-9258.

167. CARMAN, G. M.; and HAN, G. S. Phosphatidic Acid Phosphatase, a Key Enzyme in the Regulation of Lipid Synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 20080923, Jan 30, 2009, vol. 284, no. 5. pp. 2593-2597. ISSN 0021-9258; 0021-9258.

168. BAYBURT, T.; and GELB, M. H. Interfacial Catalysis by Human 85 kDa Cytosolic Phospholipase A2 on Anionic Vesicles in the Scooting Mode. *Biochemistry*, Mar 18, 1997, vol. 36, no. 11. pp. 3216-3231. ISSN 0006-2960; 0006-2960.

169. DE CARVALHO, M. G.; GARRITANO, J. and LESLIE, C. C. Regulation of Lysophospholipase Activity of the 85-kDa Phospholipase A2 and Activation in Mouse Peritoneal Macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*, Sep 1, 1995, vol. 270, no. 35. pp. 20439-20446. ISSN 0021-9258; 0021-9258.

170. DAS, S., et al. Mechanism of Group IVA Cytosolic Phospholipase A(2) Activation by Phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 20030728, Oct 17, 2003, vol. 278, no. 42. pp. 41431-41442. ISSN 0021-9258; 0021-9258.

171. IRVINE, R. F. How is the Level of Free Arachidonic Acid Controlled in Mammalian Cells?. *The Biochemical Journal*, Apr 15, 1982, vol. 204, no. 1. pp. 3-16. ISSN 0264-6021; 0264-6021.

172. FAGONE, P., et al. Phospholipid Biosynthesis Program Underlying Membrane Expansion during B-Lymphocyte Differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*, 20070109, Mar 9, 2007, vol. 282, no. 10. pp. 7591-7605. ISSN 0021-9258; 0021-9258.

173. NANJUNDAN, M.; and POSSMAYER, F. Pulmonary Phosphatidic Acid Phosphatase and Lipid Phosphate Phosphohydrolase. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, Jan, 2003, vol. 284, no. 1. pp. L1-23. ISSN 1040-0605; 1040-0605.

- 174.** LEE, Y. N., et al. Phosphatidic Acid Positively Regulates LPS-Induced Differentiation of RAW264.7 Murine Macrophage Cell Line into Dendritic-Like Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Jun 11, 2004, vol. 318, no. 4. pp. 839-845. ISSN 0006-291X; 0006-291X.
- 175.** VALENTE, V., et al. Drosophila Melanogaster Lipins are Tissue-Regulated and Developmentally Regulated and Present Specific Subcellular Distributions. *The FEBS Journal*, 20101011, Nov, 2010, vol. 277, no. 22. pp. 4775-4788. ISSN 1742-4658; 1742-464X.
- 176.** WANG, H., et al. Lipin-1gamma Isoform is a Novel Lipid Droplet-Associated Protein Highly Expressed in the Brain. *FEBS Letters*, 20110520, Jun 23, 2011, vol. 585, no. 12. pp. 1979-1984. ISSN 1873-3468; 0014-5793.
- 177.** WILSON, C., et al. Three-Dimensional Structure of the LDL Receptor-Binding Domain of Human Apolipoprotein E. *Science (New York, N.Y.)*, Jun 28, 1991, vol. 252, no. 5014. pp. 1817-1822. ISSN 0036-8075; 0036-8075.
- 178.** LU, B.; MORROW, J. A. and WEISGRABER, K. H. Conformational Reorganization of the Four-Helix Bundle of Human Apolipoprotein E in Binding to Phospholipid. *The Journal of Biological Chemistry*, Jul 7, 2000, vol. 275, no. 27. pp. 20775-20781. ISSN 0021-9258; 0021-9258.
- 179.** VALDEARCOS, M., et al. Lipin-2 Reduces Proinflammatory Signaling Induced by Saturated Fatty Acids in Macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*, 20120208, Feb 8, 2012. ISSN 1083-351X; 0021-9258.
- 180.** GRKOVICH, A., et al. TLR-4 Mediated Group IVA Phospholipase A(2) Activation is Phosphatidic Acid Phosphohydrolase 1 and Protein Kinase C Dependent. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 20090220, Oct, 2009, vol. 1791, no. 10. pp. 975-982. ISSN 0006-3002; 0006-3002.
- 181.** KRAMER, R. M.; JAKUBOWSKI, J. A. and DEYKIN, D. Hydrolysis of 1-Alkyl-2-Arachidonoyl-Sn-Glycero-3-Phosphocholine, a Common Precursor of Platelet-Activating

Factor and Eicosanoids, by Human Platelet Phospholipase A2. *Biochimica Et Biophysica Acta*, Apr 15, 1988, vol. 959, no. 3. pp. 269-279. ISSN 0006-3002; 0006-3002.

182. LICHTENBERGOVA, L.; YOON, E. T. and CHO, W. Membrane Penetration of Cytosolic Phospholipase A2 is Necessary for its Interfacial Catalysis and Arachidonate Specificity. *Biochemistry*, Oct 6, 1998, vol. 37, no. 40. pp. 14128-14136. ISSN 0006-2960; 0006-2960.

183. KARIMI, K.; and LENNARTZ, M. R. Protein Kinase C Activation Precedes Arachidonic Acid Release during IgG-Mediated Phagocytosis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, Dec 15, 1995, vol. 155, no. 12. pp. 5786-5794. ISSN 0022-1767; 0022-1767.

184. LIN, L. L., et al. CPLA2 is Phosphorylated and Activated by MAP Kinase. *Cell*, Jan 29, 1993, vol. 72, no. 2. pp. 269-278. ISSN 0092-8674; 0092-8674.

185. BALBOA, M. A.; BALSINDE, J. and DENNIS, E. A. Phosphorylation of Cytosolic Group IV Phospholipase A(2) is Necessary but Not Sufficient for Arachidonic Acid Release in P388D(1) Macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Jan 7, 2000, vol. 267, no. 1. pp. 145-148. ISSN 0006-291X; 0006-291X.

186. BALBOA, M. A., et al. Proinflammatory Macrophage-Activating Properties of the Novel Phospholipid Diacylglycerol Pyrophosphate. *The Journal of Biological Chemistry*, Jan 1, 1999, vol. 274, no. 1. pp. 522-526. ISSN 0021-9258; 0021-9258.

187. PETTUS, B. J., et al. Ceramide 1-Phosphate is a Direct Activator of Cytosolic Phospholipase A2. *The Journal of Biological Chemistry*, 20031215, Mar 19, 2004, vol. 279, no. 12. pp. 11320-11326. ISSN 0021-9258; 0021-9258.

188. CASAS, J., et al. Requirement of JNK-Mediated Phosphorylation for Translocation of Group IVA Phospholipase A2 to Phagosomes in Human Macrophages. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 20090722, Aug 15, 2009, vol. 183, no. 4. pp. 2767-2774. ISSN 1550-6606; 0022-1767.

189. CASAS, J., et al. The Cationic Cluster of Group IVA Phospholipase A2 (Lys488/Lys541/Lys543/Lys544) is Involved in Translocation of the Enzyme to

Phagosomes in Human Macrophages. *Journal of Lipid Research*, 20090828, Feb, 2010, vol. 51, no. 2. pp. 388-399. ISSN 0022-2275; 0022-2275.

