

Resumen de tesis doctoral

Regulación temporal del metabolismo de fosfatidilcolina y otros glicerofosfolípidos en células en cultivo (*Temporal regulation of phosphatidylcholine and other glycerophospholipids metabolism in cell culture*)

Tesista: Victoria A. Acosta Rodríguez

vacosta@fcq.unc.edu.ar

Departamento de Química Biológica-CIQUIBIC (CONICET), Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Los relojes circadianos distribuidos en diferentes órganos y tejidos regulan la organización temporal de diversos procesos bioquímicos y fisiológicos en los organismos vivos. En particular, la alteración de los relojes circadianos ocasiona graves trastornos metabólicos en el organismo tales como la obesidad y la diabetes. Actualmente, se ha caracterizado la capacidad de oscilación autónoma de cada célula individual que componen un órgano o tejido que funciona como reloj. Incluso algunas líneas celulares inmortalizadas presentan oscilaciones a nivel molecular. En nuestro laboratorio se demostró que existe un control circadiano sobre la síntesis de fosfolípidos totales en cultivos de fibroblastos inmortalizados. Sin embargo, todavía se desconoce si relojes internos regulan el metabolismo de glicerofosfolípidos (GFL) y cuáles serían los puntos de control temporal.

En este trabajo, se estudió el perfil temporal de actividad y expresión de enzimas que participan en el metabolismo de GFL y particularmente de fosfatidilcolina (PC) en fibroblastos NIH3T3 crecidos a confluencia y sincronizados con un shock de suero. Inicialmente determinamos que existe un patrón rítmico en las actividades de las enzimas ácido lisofosfatídico aciltransferasa (LPAAT) y fosfatidato fosfohidrolasa 1 (PAP-1) que catalizan eventos tempranos en la síntesis *de novo* de GFLs. A su vez, se observó que el perfil de actividad PAP-1 se correlaciona con los cambios diarios en la síntesis *de novo* de GFLs previamente descriptos en el laboratorio.

Adicionalmente, detectamos cambios temporales en la actividad de las enzimas lisofosfolípido aciltransferasas (LFLAT) que participan en el remodelado lipídico mediante la incorporación de ácidos grasos a diferentes lisofosfolípidos. En este caso, se observó un perfil de actividad en antifase al detectado en la síntesis *de novo*, sugiriendo que ambos eventos podrían compensarse a fin de mantener la homeostasis celular de GFLs. En este sentido, se estableció efectivamente que la composición relativa y el contenido total de GFLs permanecen constantes en el tiempo. Asimismo, observamos que existe una regulación temporal sobre la biosíntesis de fosfatidilcolina (PC), el glicerofosfolípido mayoritario de las membranas de células eucariotas. La PC se sintetiza principalmente a través de la vía de Kennedy, siendo Colina Kinasa (CK) y CTP: fosfocolina citidililtransferasa (CCT) las principales enzimas reguladoras. Antecedentes del laboratorio indicaban que la actividad CCT incrementa puntualmente precediendo a los aumentos en la síntesis de PC. Sin embargo resultados de este trabajo mostraron que la expresión de los transcritos y proteínas de las isoformas de CCT permanecen constantes en el tiempo. Por el contrario, determinamos oscilaciones circadianas en la expresión del mRNA de CK α y en la actividad CK total que correlacionan con los cambios diarios en la síntesis *de novo* de PC previamente descriptos en el laboratorio. Análogamente, detectamos que no existen oscilaciones temporales sostenidas en la expresión del transcripto de fosfatidiletanolamina N-metil transferasa (PEMT), enzima que participa en una vía de síntesis alternativa de PC a partir de PE.

Por último, se destaca que en nuestro modelo de estudio, las oscilaciones temporales detectadas fueron independientes del ciclo celular y de señales sistémicas (externas) provenientes de otros osciladores. En conclusión, los resultados de este trabajo demuestran que el metabolismo de GFLs y particularmente de PC en fibroblastos sincronizados está sujeto a un control temporal complejo que implica cambios concertados en la expresión y/o actividad de determinadas enzimas de síntesis y remodelado.

Many organs and tissues from living organisms contain circadian clocks that regulate the temporal organization of several biochemical and physiological processes including lipid metabolism. In particular, the disruption of the circadian clock affects the metabolism of lipids leading to severe metabolic disorders in the organism, such as obesity and diabetes. Currently, it has been characterized the self-oscillation properties of each of individual cells that are part of a tissue that functions as a clock. Even immortalized cell lines acting as circadian clocks display oscillations at a molecular level. In this regard, our laboratory has demonstrated that immortalized fibroblast cultures exhibit a circadian control of the synthesis of total phospholipids. However, it remains unknown whether internal clocks regulate the metabolism of glycerophospholipids (GFL) and which are the potential temporal checkpoints.

Here, we studied the temporal profiles of activity and expression of enzymes involved in the metabolism of GFL and; particularly, of phosphatidylcholine (PC) in NIH3T3 fibroblasts grown to confluence and synchronized by serum shock.

Initially we determined a rhythmic pattern in the activities of the enzymes lysophosphatidic acid acyltransferase (LPAAT) and phosphatidate phosphohydrolase 1 (PAP-1) that catalyze early events in the *de novo* synthesis of GFLs. In turn, we observed that the profile of PAP-1 activity correlates with the daily changes in the *de novo* synthesis of GFLs previously described in our laboratory. Additionally, we found temporal changes in the enzymatic activity of lysophospholipid acyltransferases enzymes (LFLAT) involved in lipid remodeling by adding fatty acids to different lysophospholipids. The remodeling activity profile was in clear antiphase to that detected in the *de novo* synthesis, suggesting that both events might compensate each other, in order to maintain the cell homeostasis of GFLs. In this regard, it was established that the relative composition as well as the total content of endogenous GFLs remain effectively constant over the time. We investigated the temporal regulation of the biosynthesis of phosphatidylcholine (PC), the more abundant glycerophospholipid of eukaryotic cell membranes. PC is mainly synthesized through the Kennedy pathway with Choline kinase (CK) and CTP: phosphocholine citidililtransferasa (CCT) as key regulatory enzymes. Previous results in our laboratory indicated that the synthesis of PC exhibited daily changes that were preceded by brief increases in total CCT enzymatic activity. However, the results of this study demonstrate that the expression of transcripts and proteins for all CCT isoforms remain constant over time. By contrast, we determined a profile of circadian oscillations in the expression of CK α mRNA and in the total CK enzymatic activity that correlate with the daily changes in the *de novo* synthesis of PC previously described in our laboratory. In addition, we found that the mRNA expression of phosphatidylethanolamine N-methyl transferase (PEMT) remains constant along the time. It is noteworthy that in our study model, temporal oscillations detected were independent of cell cycle and external signals possibly coming from systemic oscillators, such as the central master clock located in of the hypothalamus.

In conclusion, the results presented here demonstrate that the metabolisms of GFLs and particularly of PC in synchronized fibroblasts are subject to a complex temporal control involving concerted changes in the expression and/or activities of specific synthesizing enzymes.