

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

CARACTERIZACIÓN DE LA ENZIMA DIACILGLICEROL
ACILTRANSFERASA DE EMBRIONES INMADUROS DE MAÍZ

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A

LA BIÓL. LILIÁN GABRIELA VALENCIA TURCOTTE

México, D. F.
2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RECONOCIMIENTOS

Al Dr. Rogelio Rodríguez Sotres por la dirección y sus acertados comentarios para la realización del presente trabajo.

Al comité tutorial que asesoró el desarrollo del trabajo presentado en esta tesis:

Dr. Rogelio Rodríguez Sotres, Facultad de Química, UNAM

Dr. Mario Luis Calcagno Montáns, Facultad de Medicina. UNAM

Dr. Edgardo Escamilla Marván, Instituto de Fisiología Celular, UNAM

A la Facultad de Química de la UNAM por las facilidades brindadas para mi superación académica.

Al Departamento de Bioquímica de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química de la UNAM por las facilidades brindadas para la realización de este trabajo en sus instalaciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el otorgamiento de una beca-crédito durante los estudios de maestría.

Al CONACYT por el financiamiento parcial con el proyecto 1007-PN.

Al jurado del examen oral que aceptó esta tesis como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias Bioquímicas constituido por:

Dr. Mario Luis Calcagno Montáns

Dra. Sobeida Sánchez Nieto

Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez

Dra. Martha Patricia Coello Coutiño

Dr. José de Jesús García Valdés

A Leticia García por su valiosa ayuda con los tramites relacionados con el Posgrado.

Esta tesis fue defendida en réplica oral el día 5 de abril de 2006.

DEDICATORIA

A mi madre con gratitud

A mis hermanos, cuñados y mis tres sobrinos

y a mis amigos que siempre me han brindado su apoyo

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi mayor agradecimiento a los miembros del comité tutorial por su invaluable asesoría a este trabajo y de manera muy especial al Dr. Rogelio por la dirección de la presente tesis.

Así mismo, agradezco al jurado que revisó esta tesis por contribuir con su conocimiento y por la revisión del manuscrito, especialmente a la Dra. Sobeida por su gran dedicación y al Dr. Calcagno por su ejemplo.

Mi agradecimiento a todos los maestros del posgrado de Bioquímica que participaron en mi formación académica (Facultad de Química y el Instituto de Biotecnología).

A todos mis compañeros latosos del laboratorio 115: a la (Dra.) Lara, a Ericucho, a Neto Tabaco (Ernestiux), a Bety, al Rich, a Fermincho, a los pilos (laboratorio 114), a todos los alumnos de estancias cortas, de verano, de servicio social y de Labdea por su amistad y por hacer más placentera la estancia en el laboratorio.

Agradezco infinitamente a las secretarias del posgrado Adelina González y a Leticia García por su ayuda en la tramitología. Lety muchas gracias por estar siempre dispuesta a ayudarnos.

A la Sra. Licha, a la Sra. Chuy, a la Sra. Lupita y al Sr. José Luis por su valiosísima ayuda en el laboratorio.

A mi familia por su apoyo en especial a mis sobrinas Aylin y Valeria por su capacidad de asombro insaciable y a Rodrigo (Bambam) por su fuerza.

Por último a todas aquellas personas que por falta de memoria no las haya mencionado.

ÍNDICE

1		1
INTRODUCCIÓN.....		
2		3
ANTECEDENTES.....		
2.1	La semilla de	3
maíz.....		
2.1.1	La anatomía de la semilla de	3
maíz.....		
2.1.2	Fases del desarrollo de la	4
semilla.....		
2.2	Acumulación de reservas en las	5
semillas.....		
2.2.1	Acumulación de lípidos de	5
reserva.....		
2.2.2	Estructura y formación de los cuerpos	7
lipídicos.....		
2.3	Biosíntesis de	8
triacilglicéridos.....		
2.4	Modulación de la biosíntesis de triacilglicéridos.....	14
2.5	Características de la DAG-	15
AT.....		
2.5.1	Descripción de la actividad DAG-AT y su medición.....	15
2.5.2	Localización espacio-temporal de la DAG-AT.....	16
2.5.3	El uso de detergentes en la purificación de la DAG-AT de diferentes tejidos....	17
2.5.4	Características de DAG-AT y la expresión del gene en diferentes sistemas.....	18
2.5.5	Especificidad y selectividad por su	23
sustrato.....		
2.5.6	Factores que afectan la actividad de la DAG-	24
AT.....		
2.5.7	Inhibidores de la actividad DAG-	25
AT.....		
2.6	Recapitulación de los antecedentes y justificación.....	27
3		29
HIPÓTESIS.....		
4		30
OBJETIVOS.....		
4.1	Objetivo	30
principal.....		
4.2	Objetivos	30
específicos.....		
5	MATERIALES	Y 31

MÉTODOS.....		
5.1		31
Materiales.....		
5.1.1	Sustancias	31
químicas.....		
5.1.2	Material	31
biológico.....		
5.2		31
Métodos.....		
5.2.1	Extracción de los embriones inmaduros de	31
maíz.....		
5.2.2	Preparación de la fracción	32
microsomal.....		
5.2.3	Obtención de polvos de	32
acetona.....		
5.2.4	Purificación de cuerpos lipídicos a partir de embriones inmaduros de maíz.....	32
5.2.5	Análisis de	32
lípidos.....		

5.2.6	Cuantificación de la actividad DAG-AT. Método con radioisótopos.....	33
5.2.7	Solubilización y purificación de la DAG-AT.....	33
5.2.8	Tratamiento de fracciones microsomales y cuerpos lipídicos con disolventes....	34
5.2.9	Obtención de fosfatidilcolina deslipidada a partir de lecitina de soya.....	34
5.2.10	Obtención del DAG radiactivo.....	34
5.2.11	Ensayo de la actividad DAG-AT en muestras deslipidadas y reconstituidas....	35
5.2.12	Filtración en gel usando una columna de vidrio poroso.....	35
5.2.13	Determinación de proteína.....	35
6	RESULTADOS.....	36
6.1	Diseño de un método de determinación de la actividad de la DAG-AT.....	36
6.2	Determinación de la actividad de la DAG-AT en varios tejidos evaluada por dos métodos.....	40
....		
6.3	Aplicación de dos procedimientos para purificar la DAG-AT de maíz.....	41
6.4	Efecto de los detergentes en la actividad de la DAG-AT.....	43
6.5	Las preparaciones de DAG-AT contienen DAG endógeno.....	45
6.6	Eliminación del DAG endógeno de las preparaciones microsomales.....	47
6.7	Actividad de la DAG-AT. Utilización del DAG endógeno y/o exógeno.....	49
6.8	Detección de la actividad de DAG-AT en cuerpos lipídicos de embriones maduros de maíz.....	54
6.9	Purificación de la DAG-AT por filtración en gel.....	54
7	DISCUSIÓN.....	57
8	CONCLUSIONES.....	61
9	LITERATURA CITADA.....	62
10	ANEXOS.....	71
10.1	Detergentes comerciales usados para la purificación de proteínas de membrana....	71
10.2	Determinación de proteína por el método del ácido bicinónico.....	73
10.3	Artículo: Valencia-Turcotte, L. y Rodriguez Sotres R. 2001. The treatment of purified maize oil bodies with organic solvents and exogenous diacylglycerol allows the detection and solubilization of diacylglycerol acyltransferase. <i>BBA</i> 1534 :14-26.....	74

FIGURAS, TABLAS, ANEXOS Y ESQUEMA

Figura 1	Corte longitudinal de semilla madura de maíz.....	3
Figura 2	Fases del desarrollo de la semilla.....	4
Figura 3	Estructura del triacilglicerol.....	5
Figura 4	Perfil de acumulación de proteínas y lípidos durante el desarrollo de la semilla de maíz.....	6
Figura 5	Representación de un cuerpo lipídico.....	7
Figura 6	Hipótesis del desarrollo de cuerpos lipídicos.....	8
Figura 7	Vía de síntesis del glicerol-3-fosfato.....	9
Figura 8	Vía de síntesis de ácidos grasos y triacilglicerol.....	10
Figura 9	Vía de Kennedy.....	12
Figura 10	Vía de monoacilglicerol aciltransferasa.....	13
Figura 11	Vía de la diacilglicerol transacilasa.....	13
Figura 12	Reacción catalítica de DAG-AT.....	15
Figura 13	Actividad aciltransferasa en semillas en desarrollo.....	17
Figura 14	Organización del gene de DAG-AT de <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
Figura 15	Gráfica de hidrofobicidad de DAG-AT.....	22
Figura 16	Alineamiento de algunas aciltransferasas.....	23
Figura 17	Estructura de los inhibidores de la actividad de DAG-AT.....	26
Figura 18	Medición de la actividad DAG-AT.....	36
Figura 19	Método de cuantificación coenzima A libre.....	37
Figura 20	Comparación de dos métodos para la determinación de la actividad DAG-AT.....	38
Figura 21	Velocidad de la producción de NADH en el método enzimático acoplado cíclico.....	39
Figura 22	Curva de saturación de la actividad DAG-AT con oleoil coenzima A...	41
Figura 23	Perfil de actividad de DAG-AT en columna de DEAE Sephacel.....	42
Figura 24	Perfil de actividad de DAG-AT en columna de filtración Superdex-200.....	42
Figura 25	Actividad de DAG-AT en presencia de diferentes detergentes.....	43
Figura 26	Estabilidad de DAG-AT en presencia de diferentes detergentes.....	44
Figura 27	Actividad recuperada de DAG-AT tratada con MEGA-8.....	45
Figura 28	TLC de lípidos extraídos de fracción microsomal y soluble.....	46
Figura 29	TLC de lípidos extraídos de fracción microsomal con diferentes	

	disolventes.....	48
	..	
Figura 30	Actividad remanente de DAG-AT después de los lavados con disolventes.....	48
	..	

Figura 31	Actividad de DAG-AT con DAG/tween y oleoil coenzima A.....	49
Figura 32	Actividad de la DAG-AT con DAG y oleoil coenzima A con y sin marca radiactiva.....	50
Figura 33	Actividad de DAG-AT deslipidada y reconstituida.....	51
Figura 34	Curva de saturación de la actividad DAG-AT con dipalmitina.....	53
Figura 35	Perfil de elusión de proteína de cuerpos lipídicos y microsomas en una columna de vidrio poroso.....	56
Tabla I	Composición de reservas de la semilla de maíz.....	4
Tabla II	Contenido de lípidos y proteínas en los cuerpos lipídicos.....	7
Tabla III	Características de DAG-AT obtenida de la expresión de diferentes genes en diferentes organismos.....	19
Tabla IV	Tasa de producción de NADH en el método enzimático acoplado cíclico.....	38
Tabla V	Comparación de la actividad DAG-AT por el método con radioisótopos y el enzimático acoplado cíclico.....	40
Tabla VI	Actividad de la DAG-AT determinada por el método enzimático acoplado cíclico en diferentes tejidos.....	46
Tabla VII	Actividad de la DAG-AT en polvos de acetona.....	47
Tabla VIII	Medición de la actividad de DAG-AT con sus sustratos añadidos al medio de reacción o en el benceno.....	52
Tabla IX	Actividad de DAG-AT reconstituida con tween y medida con sus sustratos añadidos al medio de reacción o en el benceno.....	52
Tabla X	Actividad de DAG-AT reconstituida con fosfatidilcolina y medida con sus sustratos añadidos al medio de reacción o en el benceno.....	53
Tabla XI	Purificación de la actividad DAG-AT de la fracción microsomal en columna de vidrio poroso.....	54
Tabla XII	Purificación de la actividad DAG-AT de cuerpos lipídicos en columna de vidrio poroso.....	55
Esquema 1	Formación de TAG sin la participación de la actividad de DAG-AT....	59
Anexo 1	Características de los detergentes utilizados para solubilizar proteínas.	71
Anexo 2	Determinación de proteína. Método bicinconínico.....	73
Anexo 3	Artículo: Valencia-Turcotte, L. y Rodriguez Sotres R. 2001. The treatment of purified maize oil bodies with organic solvents and exogenous diacylglycerol allows the detection and solubilization of diacylglycerol acyltransferase. <i>BBA</i> 1534 :14-26.....	74

ABREVIATURAS

ABA	ácido abscísico (abscisic acid)
ACAT	acil CoA: colesterol aciltransferasa (acyl CoA:cholesterol acyltransferase)
acetyl-CoA	acetil CoA (acetyl-Coenzyme-A)
acetyl-P	acetil fosfato (acetyl phosphate)
ACP	proteína acarreadora de grupos acilo (acyl carrier protein)
acyl-CoA	acil coenzima-A (acyl coenzyme-A)
ASP	proteína estimuladora de acilación (acylation stimulating protein)
bp	pares de bases (base pair)
BSA	albúmina sérica bovina (bovin serum albumin)
cAMP	adenosina-5'-monofosfato cíclico (cyclic adenosin-5'-monophosphate)
cmc	concentración micelar crítica (concentration micellar critic)
CoA	coenzima A (coenzyme A)
CS	citrato sintasa (citrate synthase)
DAG	diacilglicerol (diacylglycerol)
DAG-AT	diacilglicerol aciltransferasa (diacylglycerol acyltransferase)
DAG-CPT	citidina difosfatocolina diacilglicerol colinafosfotransferasa (CDP-choline:1,2-diacylglycerol cholinephosphotransferase)
DGT	diacilglicerol transacilasa (diacylglycerol transacylase)
dpm	desintegraciones por minuto (desintegrations per minute)
DTT	ditiotreitól (dithiothreitol)
ER	retículo endoplásmico (endoplasmic reticulum)
FA	ácidos grasos (fatty acids)
FAS	ácido graso sintetasa (fatty acid synthase)
G3P	glicerol-3-fosfato (glycerol-3-phosphate)
G3P-AT	glicerol-3-fosfato aciltransferasa (glycerol-3-phosphate acyltransferase)
GL	glicolípidos (glycolipid)
GUS	gene reportero de la glucuronidasa (β-glucuronidase)
KAS	enzima condensante (condensing enzyme)
kDa	kilodaltones (kilodalton)
LB	cuerpos lipídicos (lipid bodies)
LPA-AT	lisofosfatidato aciltransferasa (lysophosphatidate acyltransferase)
LPC	lisofosfatidilcolina (lysophosphatidilcholine)
LPC-AT	lisofosfatidilcolina aciltransferasa (lysophosphatidilcholine acyltransferase)

MAG	monoacilglicerol (monoacylglycerol)
MAG-AT	monoacilglicerol aciltransferasa (monoacylglycerol acyltransferase)
MDH	malato deshidrogenasa (malate deshydrogenase)
MEAC	método enzimático acoplado cíclico
NAD ⁺	nicotinamida adenina dinucleótido (β-nicotinamide adenine dinucleotide)
NADH	forma ácida del NAD ⁺ (reduced β-nicotinamide adenine dinucleotide)
PA	ácido fosfatídico (phosphatidic acid)
PAP	fosfatidato fosfatasa (phosphatidate phosphatase)
PAT	fosfotransacetilasa (phosphotransacetylase)
PC	fosfatidilcolina (phosphatidylcholine)
PC-AT	fosfatidilcolina aciltransferasa (phosphatidylcholine acyltransferase)
PDAT	fosfolípido:diacilglicerol aciltransferasa (phospholipid:diacylglycerol acyltransferase)
PEG	polietilenglicol (polyethyleneglycol)
pI	punto isoeléctrico (isoelectric point)
PL	fosfolípido (phospholipid)
POPOP	2,2'-p-phenylene-bis[5-phenyloxazole]
PPO	2,5-difeniloxazole (2,1-diphenyloxazole)
PS	fosfatidilserina (phosphatidylserine)
Rb	ribosomas (ribosome)
TAG	triacilglicérido (triacylglyceride)
TCA	ácido tricloroacético (trichloroacetic acid)
TEA	trietanolamina (triethanolamine)
TLC	cromatografía de capa fina (thin layer chromatography)
WS	cera sintasa (wax synthase)

RESUMEN

La diacilglicerol aciltransferasa localizada en el retículo endoplásmico cataliza el último paso de la formación de lípidos de reserva. En este trabajo, se desarrollo un método de medición de la actividad confiable, sensible, sencillo y no radioactivo basado en la cuantificación de la CoA producto de la reacción. Tradicionalmente, las proteínas de membrana se aíslan con detergentes para su estudio. Se observó que la enzima se inhibe en un 80% con diez detergentes diferentes y no se recuperó actividad después de realizar dos protocolos de purificación en cromatografía de filtración en gel y de intercambio aniónico reportados anteriormente. También se observó que las preparaciones solubilizadas acarrean diacilglicerol, el sustrato de la enzima. Debido a lo anterior, se utilizaron diferentes disolventes para extraer lípidos de la enzima y se encontró que una mezcla de cloroformo:metanol:agua forma una solución estable de proteína. Esta solución protéica se purificó en cromatografía de filtración en una columna de vidrio poroso y se recuperó actividad de las fracciones eluídas y reconstituidas con la combinación de tween-20, diacilglicerol y fosfatidilcolina. Se logró recuperar la actividad de fracciones microsomales y de cuerpos lipídicos de embriones inmaduros de maíz.

1 INTRODUCCIÓN

La formación de la semilla es una adaptación única en el ciclo de vida de las plantas superiores, se ha estudiado con detalle a escala anatómica pero no se conocen igualmente los eventos bioquímicos que la sustentan (Borroto y Dure, 1987). El desarrollo de las semillas involucra la acumulación de reservas nutritivas y la desecación en una etapa tardía que aseguran la supervivencia por largos periodos de tiempo hasta que las condiciones ambientales sean favorables (Quatrano, 1990). El embrión vegetal tiene que cumplir con dos programas de desarrollo para que se transforme en una planta: el morfogénico y la germinación (Dure, 1975). Es importante que durante la morfogénesis se acumulen reservas que cubran los requerimientos nutrimentales de la semilla para que germine y el estudio detallado de esta etapa tiene, desde el punto de vista científico, un interés especial.

Las semillas acumulan diferentes clases de nutrimentos que son una fuente importante de alimento para el humano. El trigo, el maíz y el arroz aportan a la dieta humana cerca de un 50% de las proteínas y un 70% de los lípidos (Babayan, 1974; Shewry, 1995). Además, las semillas son parte de los nutrimentos de los animales que son criados para el consumo humano. Por ello, es fundamental que se comprendan los mecanismos que regulan la cantidad y la calidad de las reservas en las semillas para que los programas de mejoramiento de los cultivos modifiquen las variedades en forma adecuada.

El cultivo de maíz es importante para grandes conglomerados humanos, significa alimento, religión y hasta moneda. Se estima que la humanidad consume más de 800 artículos basados en maíz (Reyes-Castañeda, 1990). En México, el maíz se aprovecha como alimento para el humano o como materia prima en la industria alimenticia para la fabricación de aceite, harina, almidón, mieles de almidón y otros productos. Los aceites que se emplean para el consumo humano son de las semillas de la soya, el cártamo, el maíz, el girasol y la colza. Los principales componentes de los aceites son los triacilglicéridos (TAG). En la semilla de maíz, la acumulación de los TAG en el escutelo se encuentra regulada a nivel temporal y espacial (Murphy *et al.*, 1993). La mayoría de las semillas presentan una composición particular de sus ácidos grasos (FA) en los TAG que determinan las propiedades físicas y químicas de los aceites. Existe un gran desconocimiento de

los factores que regulan la acumulación y composición de los aceites en las semillas, a pesar de su importancia, debido a la escasa información acerca de las propiedades de las enzimas que participan en la biosíntesis de TAG.

En plantas, la síntesis de TAG se lleva a cabo por la vía de Kennedy. En esta vía participan tres enzimas aciltransferasas y una fosfolipasa específica localizadas en el retículo endoplásmico (ER). La diacilglicerol aciltransferasa (DAG-AT) es la última enzima que participa en forma exclusiva en la formación de TAG y es activa durante el desarrollo de las semillas (Cao y Huang, 1986). Esto sugiere que debe de estar sujeta a algún tipo de control (Akao y Kusaka, 1976; Griffiths *et al.*, 1988; Ichihara *et al.*, 1988; Mayorek *et al.*, 1989; Griffiths y Harwood, 1991; Perry y Harwood, 1993 a y b; Stals *et al.*, 1994 y Lehner y Kuksis, 1996). La actividad de DAG-AT es la más baja en la fracción microsomal (Ichihara *et al.*, 1988; Pacheco-Moises *et al.*, 1997a) y presenta cierta especificidad, lo que influye en la composición de los TAG (Katavic *et al.*, 1995).

El estudio de la DAG-AT se ha visto limitado debido a que su purificación se ha logrado en forma parcial porque el uso de detergentes para su solubilización a menudo inhibe su actividad. Recientemente el gene de DAG-AT se identificó basándose en su similitud con la acil CoA:colesterol aciltransferasa (ACAT, Cases *et al.*, 1998 a y b). Esto abrió el camino para clonar y secuenciar los genes de mamífero *Mus musculus*, de *Arabidopsis thaliana*, de colza *Brassica napus*, de olivo *Olea europaea*, del nemátodo *Caenorhabditis elegans* y del hongo *Mortierella ramanniana* (Hobbs *et al.*, 1999; Nykiforuk *et al.*, 1999; Weselake, *et al.*, 2000; Giannoulia, *et al.*, 2000; Bouvier-Navé, 2000a; Lardizábal *et al.*, 2001). Aún con estos avances se desconoce su estructura molecular, mecanismo de regulación, su especificidad por el sustrato y propiedades cinéticas. El presente trabajo detalla algunas de las propiedades que permiten entender mejor esta enzima y que son la causa de su resistencia a la purificación.

2 ANTECEDENTES

2.1 La semilla de maíz

2.1.1 La anatomía de la semilla de maíz

La semilla, el óvulo maduro fertilizado de las plantas, contiene las estructuras celulares, las reservas nutritivas y la maquinaria metabólica necesarias para formar una planta completa; constituye el medio natural de dispersión, propagación y perpetuación de la mayoría de las especies vegetales (Reyes-Castañeda, 1990).

La semilla de maíz (Fig. 1) es una carióspside cubierta por el pericarpio. En el interior se encuentra el embrión inmerso en el endospermo. El endospermo está constituido por dos tipos de células: las células que contienen almidón (endospermo almidonoso) y las células ricas en proteína (células de aleurona o capa de aleurona) que rodea al embrión y al endospermo. El embrión está formado por el eje embrionario y el escutelo. El eje embrionario está constituido por el hipocótilo, la radícula y la plúmula (epicótilo). El escutelo es un cotiledón modificado que constituye la región de unión entre el endospermo y el eje embrionario (Fahn, 1982).

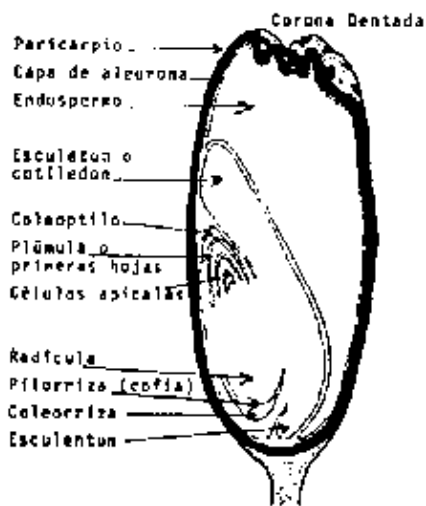


Figura 1. Corte longitudinal de semilla madura de maíz (Tomado de Reyes-Castañeda, 1990).

Las estructuras de la semilla cumplen diferentes funciones. El pericarpio sirve de protección contra organismos patógenos. El endospermo es un tejido de reserva y suministra nutrimento al embrión durante la germinación, contiene almidón, proteínas de reserva, lípidos y azúcares (Tabla I). Por su parte, el escutelo almacena proteínas y lípidos durante la maduración de la semilla y es la fuente inicial de las enzimas que hidrolizan las reservas del endospermo durante la germinación. En el eje embrionario se pueden distinguir al coleóptilo, que es el tejido que protege a los primordios foliares; al mesocótilo (nudo escutelar) que es la zona de inicio de las raíces adventicias y a la capa terminal que es una estructura esponjosa que permite la unión del embrión al olote. El eje embrionario está constituido por los tejidos que darán lugar a una planta completa (Reyes-Castañeda, 1990).

Tabla I Porcentaje de composición de reservas del grano de maíz. Composición a partir de nueve híbridos diferentes. (Tomado de Reyes-Castañeda, 1990)

Tejido de la semilla	almidón (%)	proteínas (%)	lípidos (%)	azúcares (%)
Endospermo	86.6	8.6	0.86	0.61
Embrión	8.3	18.5	34.4	11.0

2.1.2 Fases del desarrollo de la semilla

En el desarrollo de las semillas se distinguen tres fases confluentes: la histodiferenciación, la expansión y el secado (Fig. 2). La fase de histodiferenciación comprende los procesos relacionados con la división mitótica del óvulo. También incluye la formación de la capa de aleurona, la diferenciación para formar el tejido del eje embrionario (diploide) y la proliferación de los núcleos polares polinizados para formar endospermo (triploide). Durante este periodo se inicia el proceso de síntesis y acumulación de almidón en el endospermo (Sivak y Preiss, 1995).

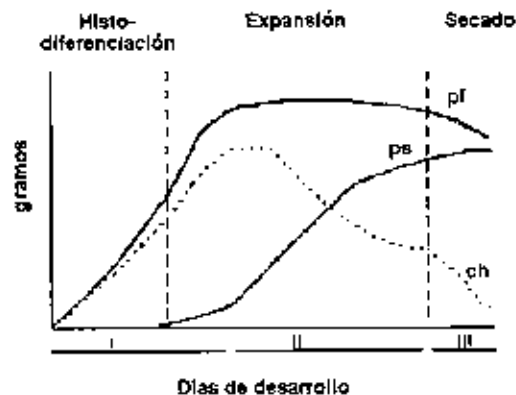


Figura 2. Fases del desarrollo de la semilla. Fase I, histodiferenciación o embriogénesis; Fase II, expansión o la acumulación de reservas y Fase III, la maduración o secado. pf=peso fresco, ps=peso seco y ch=contenido hídrico. (Tomado de Bewley y Black, 1994).

La segunda fase –la acumulación de reservas– se caracteriza por un cese de la división celular y un alto metabolismo de síntesis de macromoléculas que son depositadas en tejidos de almacenamiento. Hay un aumento muy importante en el tamaño de las células (expansión) debido a la acumulación de proteínas, lípidos, carbohidratos y otras reservas menores que se depositan tanto en el embrión (eje embrionario y cotiledón), como en el endospermo en el caso de las gramíneas. En esta etapa se consumen en grandes cantidades de nutrientes aportados por la planta madre (Bewley y Black, 1994). En esta fase, el peso seco de la semilla se incrementa casi exclusivamente debido a la ganancia de materia seca, por lo que el contenido relativo de agua se reduce significativamente y da lugar a una reducción en el potencial hídrico de la semilla (Finkelstein y Somerville, 1990).

La última fase es la maduración de los tejidos. Consiste en una pronunciada pérdida de agua o secado de la semilla. Esta fase se encuentra acoplada a la acumulación de proteínas especializadas y carbohidratos que confieren estabilidad a las estructuras celulares, particularmente a las membranas (Jiang y Kermode, 1994). Como consecuencia, en esta etapa mueren las células de la testa y del endospermo con excepción de la capa de aleurona (Mohr y Schopfer, 1995).

2.2 Acumulación de reservas en las semillas

El aporte de sacarosa por la planta madre es la forma de introducir el carbono necesario para que las semillas ensamblen compuestos de reserva. Esta sacarosa se convierte en alguna de las tres principales clases de compuestos de reserva: lípido, proteína o almidón. También, sirve para la síntesis de lípidos de membrana y de proteínas que no son de reserva. En los cereales como el trigo, el arroz y la cebada; la sacarosa se transforma principalmente en almidón, siendo los lípidos el 5% del carbono total. En el caso del chícharo y la alfalfa, las proteínas de reserva son los productos predominantes derivados de la sacarosa importada. En contraste, en las semillas oleaginosas como la colza y el cártamo, los lípidos de reserva son del 40 al 50% del total de carbono, las proteínas de reserva son del 20-30% mientras que el almidón es el producto que hay en menor cantidad (Murphy *et al.*, 1993). Los patrones de expresión y la regulación de metabolitos en el control del reparto de carbono entre lípidos y proteínas de reserva aún no han sido estudiados con suficiente detalle.

Los carbohidratos y las proteínas son las principales reservas acumuladas en el endospermo de cereales como el maíz, la cebada, el trigo, el sorgo o el mijo. Pero, los lípidos y las proteínas son las reservas más importantes en el embrión. El mecanismo que determina el que se acumule una u otra reserva podría estar influenciado por factores externos. Por ejemplo, cuando se crecen plantas de colza a temperaturas altas, la semilla acumula más proteínas, mientras que a temperatura baja los lípidos de reserva son los que predominan (Stymne y Stobart, 1987).

2.2.1 Acumulación de lípidos de reserva

La acumulación de lípidos de reserva en las plantas está regulada espacialmente. Se acumulan en los cotiledones del lino, la colza, el girasol, el cártamo y la soya; en el endospermo del ricino y del coco y en el escutelo del maíz, la cebada y el trigo. Los lípidos también se encuentran en el eje embrionario y en la capa de aleurona en las semillas de cereales (Perry y Harwood, 1993a, Cao y Huang, 1986).

Los lípidos de reserva que se acumulan en las semillas son los TAG. A diferencia de los glicerolípidos de membrana, los TAG no tienen función estructural sino que constituyen una forma eficiente de almacenamiento de energía y de carbono. Son moléculas hidrofóbicas y constan de tres FA esterificados al glicerol (Fig. 3). Los TAG se depositan en gran cantidad en estructuras subcelulares denominadas cuerpos lipídicos (LB), (Miquel y Browse, 1995).

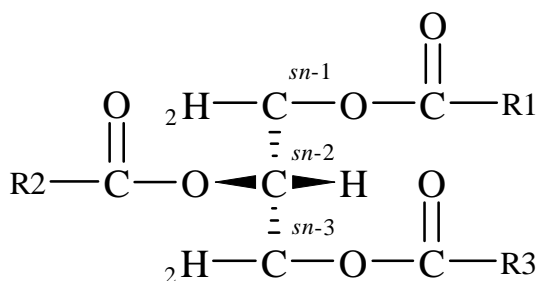


Figura 3. Estructura del triacilglicerol (TAG) R=ácido graso

La síntesis de TAG como reserva de carbono y energía no es exclusiva de los organismos vegetales. Se ha demostrado su existencia en la membrana del ER de *Saccharomyces cerevisiae* (Christiansen, 1979), los hongos *Mucor circinelloides* y *M. ramanniana* (Jackson *et al.*, 1998; Pillai *et al.*, 1998) y en animales superiores (Weiss *et al.*, 1960; Bell y Coleman, 1983).

La acumulación de lípidos de reserva en plantas está regulada temporalmente. Entre el final de la histodiferenciación y el inicio de la fase de expansión de la semilla, se dispara la deposición de lípidos en forma exponencial. Durante este periodo se sintetizan fosfolípidos (PL) y glicolípidos (GL) a una velocidad menor que la acumulación de FA y TAG. La acumulación gradual de TAG es paralela a la ganancia de peso fresco. Al final de la fase de expansión, los TAG son los predominantes y los lípidos estructurales representan solamente el 10% del contenido total de lípidos (Miquel y Browse, 1995). La acumulación cesa durante la fase de secado y se ha observado que no hay modificación de la composición de estas reservas durante el almacenamiento de la semilla (Boukhchina *et al.*, 1998) excepto cuando las semillas tienen un deterioro por condiciones inadecuadas de almacenamiento (Bewley y Black, 1994).

Los TAG y las proteínas de reserva se acumulan paralelamente a partir del doceavo día después de la polinización. La curva de acumulación de TAG en las semillas de maíz y cártamo presenta una forma sigmoide (Fig. 4) (Cao y Huang, 1986). En la colza este proceso inicia a los 21 días después de la polinización (Ichihara y Noda, 1980; Stymne y Stobart, 1987 y Tzen *et al.*, 1993).

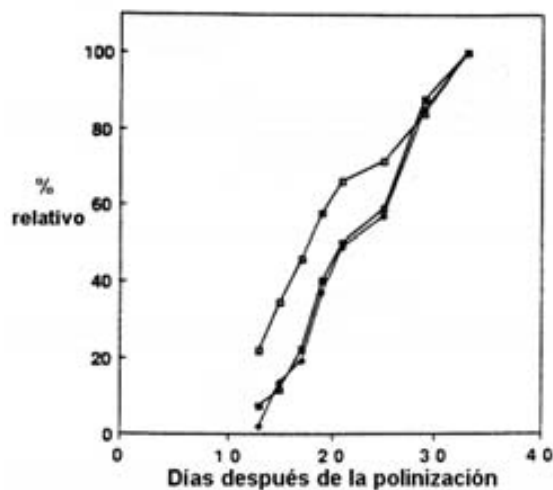


Figura 4. Perfil de acumulación de proteína total (○), triglicéridos (□) y oleosinas (△) en embriones de maíz durante su desarrollo. El contenido a los 33 días después de la polinización fue de 50, 5.04 y 10.9 mg de peso fresco, de proteína total y de lípidos neutros, respectivamente (Tomado de Tzen *et al.*, 1993).

Por otra parte, se conoce que el tipo de TAG sintetizado se modifica en la misma proporción en la que cambia la síntesis de los FA que los constituyen durante la maduración de semillas. En la semilla de girasol predominan los TAG con una alta proporción de ácido linoléico (Boukhchina *et al.*, 1998). Fenómenos similares se observan en las semillas de cacao (Griffiths y Harwood, 1991), semilla no convencional que acumula cantidades muy altas de ácido esteárico.

2.2.2 Estructura y formación de los cuerpos lipídicos

En las semillas, los TAG se acumulan en organelos subcelulares denominados cuerpos lipídicos ó LB. Están formados de una matriz de TAG rodeados por una monocapa de PL en la cual se encuentran embebidas una clase especial de proteínas específicas llamadas oleosinas (Fig. 5).

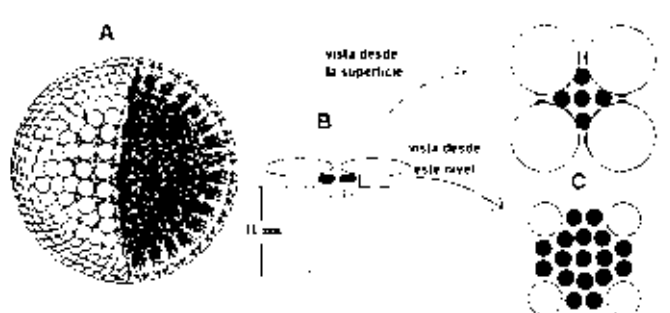


Figura 5. Representación de un cuerpo lipídico con un corte donde se observa la matriz de TAG (A), dos oleosinas con un tallo de 11 nm y dos fosfolípidos representados como óvalos unidos a dos líneas (B) y vista superficial de una unidad estructural constituida por una oleosina y 13 fosfolípidos (C) (Tomado de Huang, 1994)

El 95% del contenido total de los LB son TAG mientras que el de proteína es el 1.4 % (Tabla II). La mayoría de las proteínas en los LB de maíz son tres oleosinas con un peso molecular de 16, 18 y 19 kilodaltones, kDa, (Huang, 1994). Se identificaron otras proteínas menos abundantes llamadas caleosinas con mayor peso molecular (Chen *et al.*, 1999; Naested, *et al.*, 2000 y Frandsen *et al.*, 2001). La acumulación de TAG y de oleosinas es de manera paralela en el desarrollo de semillas de maíz (Fig. 4) de cártamo, de *A. thaliana* y de soya (Tzen *et al.*, 1993; Pacheco-Moisés, 1997b; Herman, 1987 y Zou *et al.*, 1996).

Tabla II Contenido de lípidos y proteínas en los cuerpos lipídicos de maíz expresado como porcentaje de la masa total. (Tomado de Christiansen, 1979 y Bewley y Black, 1994)

	TAG (%)	DAG (%)	fosfolípidos ¹ (%)	ácidos grasos ² (%)	lípidos polares (%)	proteína (%)
Maíz	95	2	0.9	0.09	0.7	1.4

1.-fosfatidilcolina (64%), fosfatidilserina (20%), fosfatidiletanolamina (8%) y fosfatidilinositol (7%)

2.-ác. linoléico (61%), ác. oleico (24%), ác. palmítico (12%), ác. esteárico (2%) y ác. linolénico (<1%)

Las micrografías electrónicas del ER de las semillas y consideraciones termodinámicas condujeron a proponer que los LB se sintetizan vía vesiculación. El modelo propuesto para la formación de los LB (Fig. 6) sugiere que los TAG quedan secuestrados entre las dos capas de PL de la membrana del ER. Seguidamente estos lípidos forman una yema a la cual se le unen más PL, que son sintetizados en este mismo organelo. Simultáneamente, las oleosinas, que se sintetizan en los polirribosomas unidos al ER y que no parecen requerir de un procesamiento posterior, difunden hacia la yema posiblemente dirigidas por su dominio central hidrófobo, o bien, las oleosinas recién sintetizadas se insertan directamente en la yema. Finalmente, la yema en gemación llena su matriz de TAG, quedando rodeada por oleosinas y una capa de PL. Una vez que alcanza un tamaño crítico (1.45 μm de diámetro) se libera al citosol como un LB maduro (Huang, 1996), ya que el tamaño parece estar controlado por los componentes proteínicos específicos (Murphy y Vance, 1999).

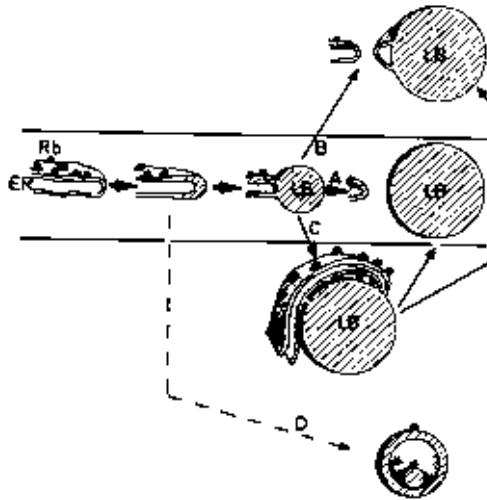


Figura 6. Hipótesis del desarrollo de cuerpos lipídicos (LB) del retículo endoplásmico (ER) Existen diversas alternativas: los LB se forman y desplazan un pedazo de ER (A); un pedazo de membrana permanece unida a los LB (B); el ER mantiene contacto con el naciente LB (C) y se forman vesículas por la síntesis continua de TAG entre la membrana (D). Rb= ribosomas (Tomado de Bewley y Black, 1994).

También se ha propuesto que la formación de los LB en plantas comparte características similares a la formación de TAG en animales y microorganismos: se forman en microdominios del ER con la maquinaria enzimática de biosíntesis de lípidos de reserva (Okila y Rogers, 1996). En este sentido, Lacey y Hills (1996) mostraron que en el ER aislado de semillas de colza existen dominios específicos para la formación de LB. Esto es, encontraron dos fracciones membranales: las de alta densidad –que contenían actividades de las enzimas de la síntesis de TAG y de PL- y las de baja densidad, que presentaron actividades casi nulas de estas enzimas. Esto sugiere que las membranas de baja densidad se derivan de un dominio del ER involucrado solamente en la formación y secreción de los LB.

2.3 Biosíntesis de triacilglicéridos (TAG)

La biosíntesis de TAG puede dividirse en dos etapas. En la primera se sintetizan la acyl-CoA y el glicerol-3-fosfato; en la segunda se ensamblan los TAG.

Primera etapa. Síntesis de los componentes básicos

Síntesis del glicerol-3-fosfato, G3P

Existen dos posibilidades de que se sintetice el G3P. La primera es por la reducción de la dihidroxiacetona-3-fosfato por la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (dependiente de nicotinamida-adenina-dinucleótido, NAD⁺), la segunda es por la fosforilación del glicerol por la glicerol cinasa (Fig. 7). Es muy probable que la segunda vía juegue un papel menor en la síntesis del G3P porque la actividad de la glicerol cinasa es muy baja en los tejidos activos en síntesis de lípidos. Por el momento, no se tiene evidencia suficiente que indique cual es la vía que tiene lugar *in vivo* (Miquel y Browse, 1995).

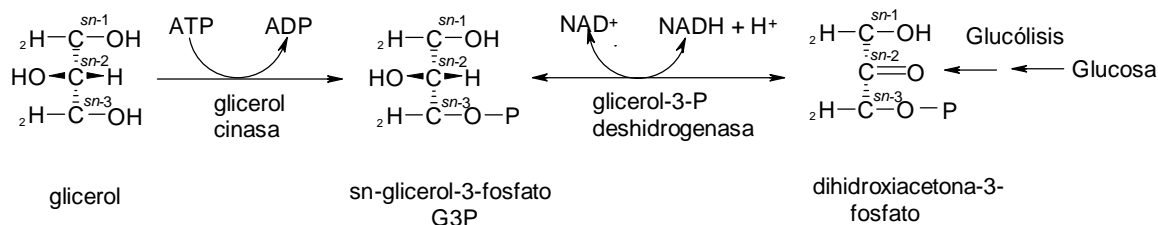


Figura 7.- Vías de síntesis del glicerol-3-fosfato (G3P). El G3P puede provenir de la dihidroxiacetona-3-P derivada de la glucólisis o de la actividad de la glicerol cinasa.

Síntesis de los acil coenzima A (acyl-CoA)

En plantas la síntesis de los acil-ACP, los precursores de los acyl-CoA, se lleva a cabo en los plastidios. En éstos organelos se encuentran la enzima málica dependiente de NADPH, el complejo piruvato deshidrogenasa y las enzimas glucolíticas que proveen de acetil coenzima A (acetyl-CoA) y de cofactores como el ATP, el NADH y la NADPH para la síntesis de los acil-ACP (Fig. 8). El paso inicial en la síntesis lo cataliza la acetil-CoA carboxilasa, su sustrato es la acetyl-CoA. La forma plastídica tiene cuatro subunidades: la proteína acarreadora de carboxilos que contiene a la biotina, la biotina carboxilasa y la carboxiltransferasa con las subunidades α y β . Estas cuatro subunidades forman un complejo heteromérico de mas de 650 kDa posiblemente asociado a membrana. En la reacción se carboxila un acetyl-CoA a partir de bicarbonato. Primero se forma un intermediario de carboxibiotina a expensas de ATP y luego se transfiere el CO_2 activado a la acetyl-CoA para formar el malonil-CoA. Posteriormente, el complejo multienzimático ácido graso sintetasa realiza carboxilaciones subsecuentes y repetitivas para incorporar dos carbonos a la vez hasta que se obtiene un producto de 16 o 18 átomos de carbono. El alargamiento de la cadena de acilos, a partir de malonil-CoA y acetyl-CoA, es catalizada por la ácido graso sintetasa (FAS). La FAS se refiere a todas las actividades enzimáticas en la biosíntesis de ácidos grasos excepto la acetil-CoA carboxilasa. Las reacciones catalizadas por FAS son esencialmente las mismas en todos los organismos, sin embargo se han descrito dos tipos en la naturaleza. Las plantas y algunas bacterias presentan la FAS tipo II, en la que cada actividad catalítica reside en una proteína individual incluyendo la proteína acarreadora de grupos acilos (ACP). La ACP es una proteína pequeña (80 aminoácidos) que contiene un grupo prostético llamado fosfopanteteína. La ACP está involucrada en la síntesis de ácidos grasos cuando el malonil-CoA (producto de la acetil-CoA carboxilasa) es transesterificado al sulfidrilo de la ACP por la malonil-CoA transacilasa para formar malonil-ACP. También el acetil-CoA es transesterificado con ACP por la acetil CoA: ACP transacilasa produciendo acetil-ACP. La acetil-CoA y el malonil-CoA se condensan para formar un compuesto de 4 carbonos (acetoacetil-ACP) reacción catalizada por la 3-cetoacil-ACP sintasa, comúnmente llamada enzima condensante (KAS). Los tres últimos pasos en la síntesis de ácidos grasos reducen el acetoacetil-ACP hasta formar una cadena de acilos saturada. El grupo cetona del 3-cetoacil ACP es convertido a un grupo alcohol por la 3-cetoacil ACP reductasa dependiente de NADPH. Enseguida la remoción de una molécula de agua (deshidratación) para formar 2,3 *trans*-enoil-ACP es catalizada por la 3-hidroxiacil ACP deshidratasa. El paso final es una reducción del 2,3 *trans*-enoil ACP por la enoil-ACP reductasa formando el acil-ACP saturado. Los productos de la síntesis de FAS II en el plastidio son los 16:0-ACP, 18:0-ACP y 18:1 Δ^9 -ACP. Éstos acil-ACP son utilizados por las aciltransferasas para la síntesis de PL y GL de las membranas del plastidio, o son hidrolizados en el estroma del plastidio por tioesterasas y exportados como ácidos grasos libres (ácido palmítico, esteárico y oléico) a otros compartimentos celulares por un mecanismo que aún no se conoce (Somerville, *et al.*, 2000).

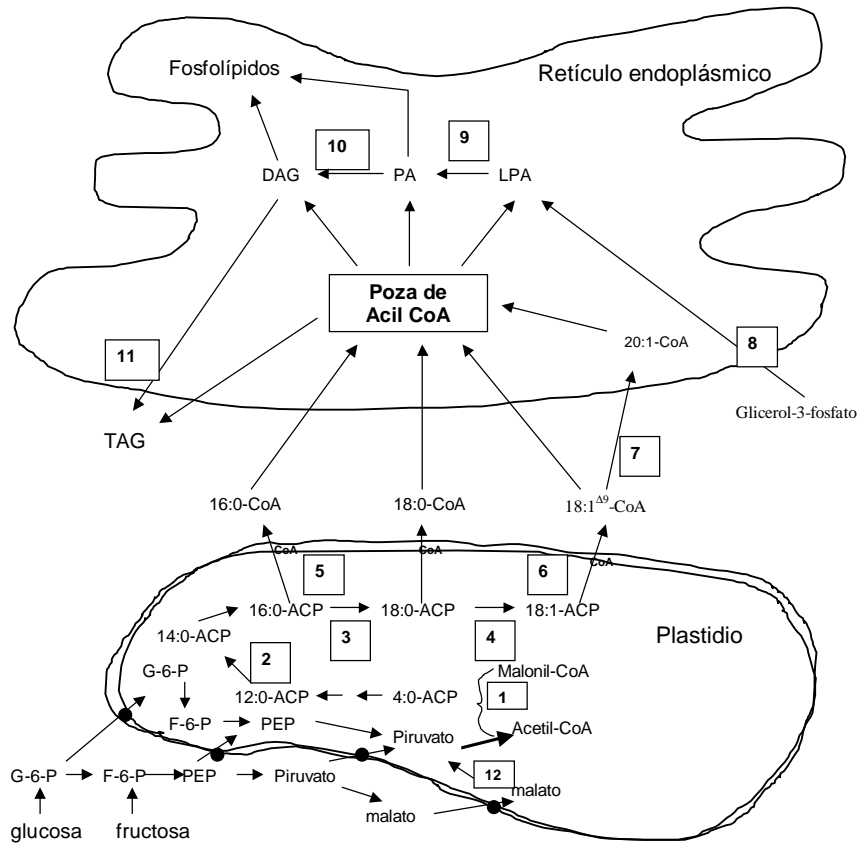


Figura 8. Biosíntesis de ácidos grasos y triacilglicéridos. La síntesis de FA involucra a una serie de enzimas localizadas en el plastidio y la subsecuente formación de TAG ocurre en las membranas del retículo endoplásmico. 1, acetyl CoA carboxilasa; 2, KAS I; 3, KAS II; 4, oleoil-ACP-desaturasa; 5, palmitoil-ACP-tioesterasa; 6, oleoil-ACP-tioesterasa; 7, oleato elongasa; 8, glicerol-3-fosfato aciltransferasa; 9, lisofosfatidato aciltransferasa; 10, fosfatidato fosfatasa; 11, diacilglicerol aciltransferasa y 12, enzima málica. KAS=3-cetoacil-ACP-sintasa, ACP=proteína acarreadora de grupos acilos, LPA=lisofosfatidato, PA=ácido fosfatídico, DAG=diacilglicerol, TAG=triacilglicerol, G-6-P=glicerol-3-fosfato, F-6-P=fructosa-6-fosfato y PEP=fosfoenolpiruvato.

También los acil-ACP son exportados al citoplasma como ésteres de CoA e incorporados a los lípidos en el RE (Fig. 8). Los mecanismos por los cuales los acilos son transportados entre organelos son desconocidos (Buchanan, *et al.*, 2000).

Modificación de los ácidos grasos

Los FA experimentan reacciones posteriores de elongación, desaturación, hidroxilación y ramificación. Las reacciones más frecuentes de modificación de los FA son las desaturaciones que ocurren en el plastidio. Un ejemplo es el del ácido esteárico que se convierte hasta ácido oleico por la oleoil-ACP desaturasa antes de que sea liberado de su unión con la ACP (Schnurr, *et al.* 2000). Sin embargo, algunas evidencias sugieren que las reacciones de desaturación ocurren fuera del plastidio, incluso hasta cuando los FA se han incorporado a los PL de la membrana (principalmente fosfatidilcolina, PC) en el ER (Williams, *et al.*, 2000). En las semillas oleaginosas, la variedad de FA encontrados -más de 300 diferentes- se debe principalmente a reacciones de desaturación.

Segunda etapa. Ensamblado de los TAG

El ensamblado del TAG se lleva a cabo de diferentes maneras: con la participación de aciltransferasas (tres vías) y una vía con la actividad de transacilasa. La vía de Kennedy es la primera que se describió para la síntesis de TAG y la que ocurre con mayor frecuencia. En esta vía participan tres aciltransferasas y una fosfohidrolasa, se encuentra en el ER de hongos filamentosos, en las levaduras, en las semillas en desarrollo de las plantas y en mamíferos (tejido adiposo y hepático). Otra vía descrita es la de la monoacilglicerol aciltransferasa, que ocurre en el intestino de mamíferos. La vía de la fosfolípido: diacilglicerol aciltransferasa está presente en levaduras y algunas plantas. Por último, la vía de la transacilasa se encuentra en semillas en desarrollo de plantas superiores pero también se ha encontrado en el intestino y el hígado de mamíferos.

Vía de Kennedy

En esta vía participan tres aciltransferasas y una fosfohidrolasa específica (Fig. 9). Consiste en la incorporación sucesiva de dos moléculas de FA (como acil coenzima-A, acyl-CoA) en las posiciones *sn*-1 y *sn*-2 del glicerol-3-fosfato para formar ácido fosfatídico (PA). Enseguida, el PA se convierte a DAG por la fosfatidato fosfatasa (PAP) y finalmente, se incorpora al DAG una tercera unidad de FA, también proveniente del acyl-CoA citoplásmico, para formar TAG. La enzima que realiza la primera acilación es la glicerol-3-fosfato aciltransferasa (G3P-AT, E.C. 2.3.1.15), posteriormente la lisofosfatidato aciltransferasa (LPA-AT, E.C. 2.3.1.51) realiza la segunda acilación y la diacilglicerol aciltransferasa (DAG-AT, E.C. 2.3.1.20) realiza la acilación en la posición *sn*-3 para formar TAG (Ohlrogge y Browse, 1995).

La vía de Kennedy se encuentra en el ER de hongos filamentosos, en las levaduras, en las semillas de las plantas y en mamíferos (tejido adiposo y hepático). Sin embargo, se ha demostrado -por primera vez- que la biosíntesis de TAG en la levadura oleaginosa *Rhodotorula glutinis* se lleva a cabo en el citosol. En esta levadura de yemas de color rosa, el 50% del peso seco son lípidos. La biosíntesis de TAG la realiza un complejo multienzimático de 200 kDa. Este complejo contiene las actividades de la LPA-AT, PAP, DAG-AT, proteína acil-acil acarreadora sintasa y la ACP; además, tiene la particularidad de que incorpora rápidamente FA libres y en forma de acyl-CoA (Gangar, *et al.*, 2001). A pesar de las múltiples evidencias que apoyan la existencia de una mutua regulación cruzada, la naturaleza de la comunicación entre la síntesis de FA en el plastidio, la composición de los FA y la vía de Kennedy no son bien comprendidas, ni se ha identificado a la (s) molécula (s) involucrada (s) en dicha intercomunicación (Ohlrogge, 1997).

La vía de la fosfolípido: diacilglicerol aciltransferasa (PDAT)

La reacción catalizada por la fosfolípido: diacilglicerol aciltransferasa o PDAT es otra vía de síntesis de TAG independiente de acyl-CoA. Este mecanismo utiliza a los PL como acildonadores y al DAG como aceptor. El gene que codifica para la PDAT está estrechamente relacionado con la lecitin:colesterol aciltransferasa, la cual cataliza la síntesis de ésteres de colesterol independiente de acyl-CoA (Dahlqvist, *et al.* 2000). La actividad de la PDAT permite que se incorporen preferentemente grupos vernoleoil en semillas oleaginosas como el girasol y *Crepis palaestina*; en ricino incorpora además grupos ricinoleoil. En *S. cerevisiae* existen cuatro genes que se transcriben para proteínas involucradas en la esterificación del DAG para formar TAG. Uno de estos genes -el gene LRO1- codifica para la proteína del ER con actividad PDAT (Oelkers, *et al.*, 2002).

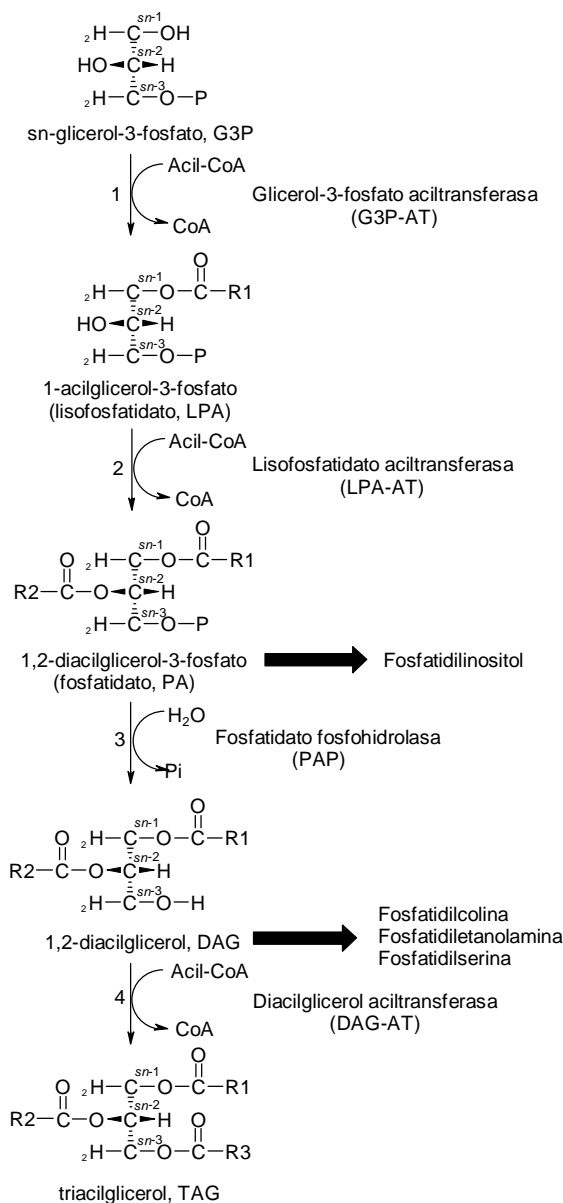


Figura 9. Vía de Kennedy. Biosíntesis de triacilgliceroles.
R= ácido graso

Vía de la monoacilglicerol aciltransferasa (MAG-AT)

En el intestino de rata se sintetiza TAG sin la formación de fosfatidato. El producto de la digestión, el 2-monoacilglicerol (MAG), se absorbe en la mucosa intestinal de mamíferos. En este tejido, la actividad enzimática de la MAG-AT incorpora una unidad de FA (del acil-ACP citoplásmico) en la posición uno del MAG para generar DAG (Fig. 10). Es posible que la DAG-AT acile un FA en la posición tres del DAG para formar TAG; sin embargo, se tiene evidencia que los productos de la MAG-AT son utilizados para la biosíntesis de glicerofosfolípidos (Lenher y Kuksis, 1996). En la biosíntesis de TAG del epitelio intestinal de mamíferos, el grado de interacción entre las vías de Kennedy y la MAG-AT aún no se han estudiado exhaustivamente. Ambas rutas compiten por la misma poza de FA y ambas producen DAG. Lo que resulta evidente es que las dos rutas dependen de un aporte continuo de *sn*-1,2-DAG y la DAG-AT posee un papel importante en ambas vías.

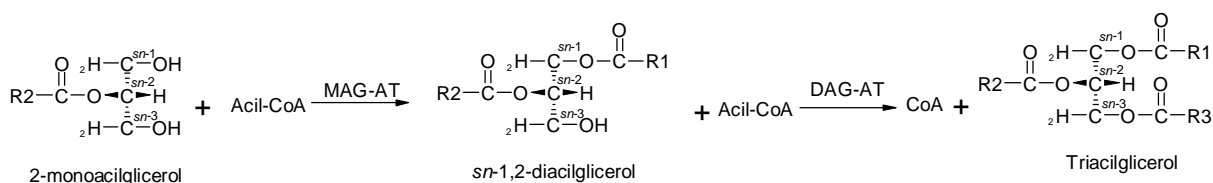


Figura 10. Biosíntesis de triacilgliceroles por la vía de la monoacilglicerol aciltransferasa. R=ácido graso (Tomado de Lehner y Kuksis, 1996)

Vía de la diacilglicerol transacilasa (DGT)

La formación de TAG puede darse sin la participación de las enzimas de la vía de Kennedy. Durante los últimos años se ha obtenido evidencia de la existencia de la DGT, que genera TAG en tejidos animales y en semillas oleaginosas.

El caso de mamíferos

El aislamiento de una proteína con actividad transacilasa (52 kDa) de la fracción microsomal de mucosa intestinal de rata, ha sugerido una ruta de biosíntesis de TAG que no depende de acyl-CoA. La DGT, cataliza la transesterificación de un grupo acilo entre dos moléculas de DAG -con estereoquímica *sn*-1,2 y *sn*-1,3- para formar una molécula de TAG y otra de 2-MAG (Fig. 11). Debido a que esta reacción es reversible, los TAG no conservan las diferencias de composición en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3, puesto que son recambiados constantemente. La función precisa de la DGT aún no es conocida, pero se cree que participa en la resíntesis de TAG contribuyendo a la redistribución de los FA que forman los TAG. Lo que se conoce es que la DGT es incapaz de remover los FA de la fosfatidilcolina o de transferirlos del DAG a la lisofosfatidilcolina (Lehner y Kuksis, 1993).

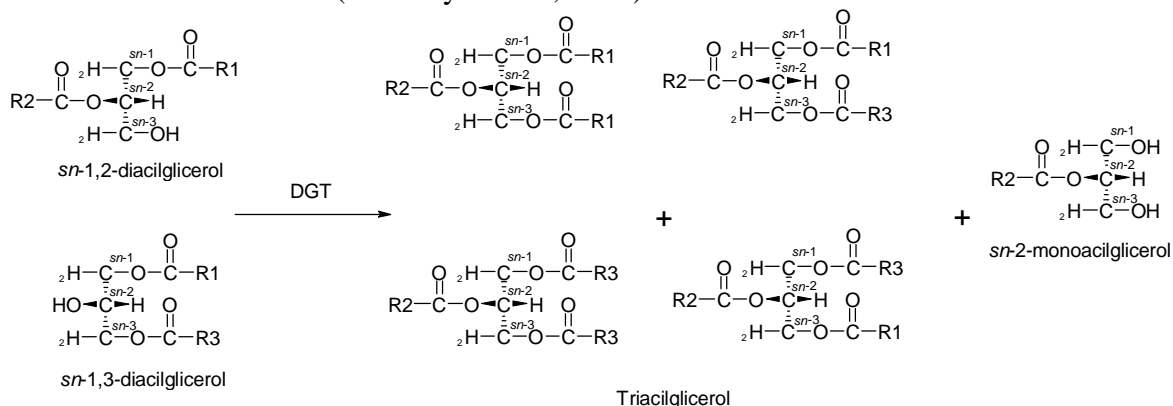


Figura 11. Biosíntesis de triacilgliceroles por la diacilglicerol transacilasa independiente de acyl-CoA. (Tomado de Lehner, R. y Kuksis, A. 1993)

Las reacciones de transesterificación de acilglicéridos no son nuevas. Diversas lipasas - como la lipasa hepática del hígado de rata- pueden catalizar una reacción de transacilación. Esta lipasa transfiere los FA desde los glicéridos a un hidroxilo libre de un aceptor lipídico o a la molécula de agua (Waite y Sisson, 1973). También se ha demostrado la transferencia de FA desde la PC al colesterol (por la ACAT, Field y Mathur, 1995). Por ello se han utilizado diversas lipasas y esterasas en reacciones de trans y de esterificación para generar enantiómeros de manera selectiva (Wong y Whitesides, 1994).

El caso de las semillas en desarrollo

Se ha reportado la actividad de DGT en la fracción microsomal de los cotiledones de semillas de girasol en desarrollo (Lehner y Kuksis, 1993). En este caso, se demostró que no existe una acilación directa del MAG. El análisis estequiométrico de la redistribución de acilos en el esqueleto del glicerol indicó que la transacilación se da entre el DAG y la PC de manera reversible. Stobart y otros autores (1997) también encontraron evidencia -en semillas de cártamo- de la participación de la PC, pero no explican la aparición de MAG y su conversión a DAG. Es probable que la composición de los FA en la posición *sn*-1 del TAG esté limitada debido a que el reservorio citoplasmático de acyl-CoA sea poco diverso o que la G3P-AT sea específica. Debido a que la transacilación permite la incorporación de acilos en el TAG, este mecanismo adquiere gran relevancia para explicar la calidad de los aceites vegetales.

2.4 Modulación de la biosíntesis de TAG

Revisamos previamente que para formar TAG se requiere de la síntesis y del ensamble de sus componentes. A continuación se presentan las explicaciones que algunos autores han propuesto para la modulación de la biosíntesis de TAG.

En embriones de maíz en desarrollo, la inhibición de la biosíntesis de FA afecta la formación de TAG, pero su estimulación no conduce a una mayor cantidad de aceite (Altuzar-Martínez, 2000). Sin embargo, en los cultivos de células en suspensión de *B. napus* L. cv Jet Neuf con sacarosa se incrementa un RNA mensajero que probablemente codifica para una ACP mitocondrial de *A. thaliana*, se incrementa la actividad de la DAG-AT, la biosíntesis y almacenamiento de TAG. Esto sugiere que la biosíntesis de FA en la mitocondria y la biosíntesis de TAG en el ER están de alguna manera relacionadas (Davoren, et al. 2002).

Bao y Ohlrogge (1999) observaron que la velocidad de síntesis de TAG *in vivo* fue de dos a cuatro veces superior en embriones en desarrollo de *Cuphea lanceolata*, *Ulmus carpinifolia* y *Ulmus parvifolia* si se adiciona ácido decanoico.

Es posible que una tioesterasa específica para acil-ACP de cadena corta sea la responsable de controlar el flujo de FA desde los plastidios hasta otros compartimentos y el citoplasma (Roesler *et al.*, 1997; Rangasamy y Ratledge, 2000). En *B. napus* se sobreexpresó una tioesterasa afectando la composición de aceite (Eccleston *et al.*, 1996) o estimulando la biosíntesis de FA (Eccleston y Ohlrogge, 1998).

Las cadenas de FA son modificadas (desaturadas, hidroxiladas y peroxidadas) cuando se encuentran en la molécula de PC pero recordemos que debido a la actividad de las transacilasas puede existir recambio de FA entre la fosfatidilcolina y los reservorios citoplasmáticos de acyl-CoA (Williams *et al.*, 2000) o entre los FA esterificados al DAG y la PC por la PDAT y la DGT. Luego, los FA pueden regresar a los acyl-CoA para ser sustratos de las aciltransferasas en la vía de Kennedy para la formación de TAG. También, el DAG se convierte a PC por la reacción reversible catalizada por la citidina difosfatocolina:diacilglicerol colinfosfotransferasa (DAG-CPT; Stobart y Stymne, 1985); pero también la acil-CoA:L- α -lyso-fosfatidilcolina *O*-aciltransferasa (LPC-AT) cataliza la acilación reversible de la lisofosfatidilcolina (LPC) a fosfatidilcolina. Adicionalmente, se ha demostrado que las fracciones microsomales de semillas en desarrollo de soya, cártamo y girasol son capaces de intercambiar acyl-CoA y PA, reacción catalizada por una acil-CoA:fosfatidilcolina aciltransferasa (PC-AT; Stymne y Stobart, 1984). Hasta la fecha, no se

ha demostrado si estos fenómenos poseen algún grado de control sobre el flujo a través de la ruta de biosíntesis.

Las mutantes afectadas en la ruta de biosíntesis de TAG (vía de Kennedy) producen menor cantidad de aceites y mayor proporción de FA insaturados (Katavic *et al.*, 1995).

Durante el periodo de síntesis de lípidos en semillas en desarrollo de colza, los DAG se incrementan aún durante la fase de máxima síntesis de TAG. Ésto puede sugerir que la DAG-AT ejerce control sobre el flujo del carbono *in vivo* e *in vitro* (Perry y Harwood, 1993a y b).

En semillas en desarrollo de cártamo la actividad de la DAG-AT fue más lenta que las otras dos aciltransferasas en la vía de Kennedy, lo que sugiere fuertemente que la acilación del DAG es el paso importante en la vía de síntesis del TAG (Ichihara *et al.*, 1988).

La reducción en la actividad de la DAG-AT correlaciona con la reducción de la síntesis de TAG (Pacheco-Moisés *et al.* 1997b).

2.5 Características de la diacilglicerol aciltransferasa (DAG-AT)

2.5.1 Descripción de la actividad DAG -AT y su medición

La DAG-AT (acil-CoA: 1,2-diacilglicerol *O*-aciltransferasa E.C. 2.3.1.20) es la última enzima de la vía de Kennedy que cataliza la esterificación en la posición *sn*-3 del 1,2-*sn*-diacilglicerol (DAG). La DAG-AT emplea un ácido graso en forma de acyl-CoA como donador del acilo (Fig. 9 y 12). La actividad de la DAG-AT está asociada al ER, sin embargo no está claro la accesibilidad al sitio activo. Los estudios de Bell y Coleman (1983) proponen que el sitio activo de la DAG-AT se encuentra únicamente en la cara citoplasmática del ER mientras que los resultados de Owen y colaboradores (1997) lo localizan en ambas caras. El pH óptimo reportado para diversos tejidos se encuentra alrededor de siete (Ichihara *et al.*, 1988; Cao y Huang, 1986; Sukumar y Sastry, 1987; Martin y Wilson, 1984 y Kamisaka y Nakahara, 1994).

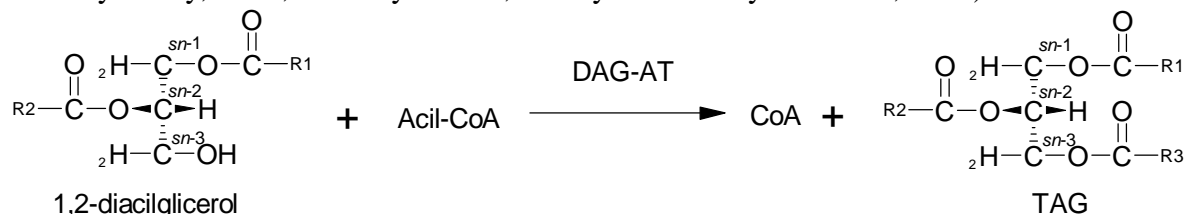


Figura 12. Reacción enzimática catalizada por la diacilglicerol aciltransferasa (DAG-AT). R= ácido graso.

En ciertos organismos, la DAG-AT presenta una función adicional. En *A. thaliana* y en las bacterias *Acinetobacter calcoaceticus* y *Mycobacterium smegmatis* se describió una actividad DAG-AT/WS (WS, cera sintasa). En éstos organismos, la DAG-AT cataliza la formación de ceras y lípidos de reserva (TAG). Esta bifuncionalidad no se relaciona con otras actividades WS o con los genes diacilglicerol o fosfolípido aciltransferasa descritas para plantas, levadura y animales. Se señala su potencial biotecnológico, puesto que al expresar este gene en *Pseudomonas citronellolis* se obtienen ceras muy parecidas a las de la jojoba (Kalscheuer y Steinbuechel, 2003).

La medición de la actividad de la DAG-AT presenta características especiales. Debido a que sus sustratos son insolubles en medios acuosos, el DAG se añade en solución etanólica, acetónica, en dioxano-propilenglicol o emulsificado con Tween-20 o taurocolato de Na⁺. Además, se requiere de diversos [¹⁴C]-acylCoA para cuantificar el producto marcado.

El ensayo descrito por Cao y Huang (1986) es el más común para la medición de la actividad de la DAG-AT. En este ensayo se emplea el 1-[¹⁴C]oleoil-CoA y la 1,2-dipalmitina emulsificados con tween-20 como el donador y el aceptor del acilo, respectivamente. Lozaman (1995) utilizó microsomas liofilizados y suspendidos en benceno/ DAG para medir la actividad de la DAG-AT en amortiguador acuoso en presencia de [¹⁴C]oleoil-CoA después de sonicar y eliminar el disolvente por evaporación. También Vogel y Browse (1996) han utilizado benceno para disolver acilaceptores (DAG) en los ensayos de DAG-AT en plantas.

2.5.2 Localización espacio -temporal de la DAG-AT

La actividad de la DAG-AT se encuentra en todas las células que realizan biosíntesis de TAG. Se ha descrito en *M. smegmatis* (Akao y Kusaka, 1976), en fracciones microsomales de hígado de pollo (Weiss *et al.*, 1960), de hígado y corazón de rata (Ozasa *et al.*, 1989; Polokoff y Bell, 1980 y Shoonderwoerd *et al.*, 1990); de *S. cerevisiae* (Christiansen, 1979) y del hongo oleaginoso *M. ramanniana* var. *angulispora* (Kamisaka y Nakahara, 1994).

También la DAG-AT se encuentra en plantas, en fracciones microsomales de escutelo de maíz, de semillas en desarrollo de ricino, canela, colza y cacahuete (Cao y Huang, 1986), de soya (Kwanyuen y Wilson, 1986), de cártamo (Ichihara y Noda, 1982), en cloroplastos de espinaca (Martin y Wilson, 1984) y también está presente en LB de aceite de palma, de ricino y del hongo *M. ramanniana* (Oo y Chew 1992; Settlege *et al.*, 1995 y Pillai *et al.*, 1998).

En *A. thaliana* hay un incremento de la actividad DAG-AT durante el desarrollo de la semilla. La actividad DAG-AT se localiza en el embrión cinco días después de la polinización. En la fase de acumulación de lípidos la actividad específica se incrementa rápidamente y existe un decremento muy marcado cuando los niveles de lípidos se encuentran en una meseta de acumulación. Posteriormente, declina gradualmente hasta la etapa de desecación cuando las semillas adquieren una tonalidad café (Lu, *et al.* 2003). El comportamiento es semejante en semilla de colza, de cártamo (ver Fig. 13a, b y d; Weselake *et al.*, 1993; Little *et al.*, 1994 y Tzen *et al.*, 1993) y de cacahuete (Fig. 13c; Sukumar y Sastry, 1987).

En *A. thaliana* el gene que codifica para la DAG-AT se expresa durante la germinación y el establecimiento de la plántula. El gene DGAT1, que codifica para la DAG-AT se fusionó al gene reportero de la glucuronidasa (GUS), se expresa abundantemente en semillas en desarrollo, pero también en inflorescencias y en el tallo de plántulas. En estas plantas transgénicas, la expresión del gene se correlacionó con la rápida división y crecimiento celular, debido a que se localizó en las regiones apicales de las raíces y el tallo. Además, la expresión también se detectó en polen en desarrollo en donde ocurre normalmente la síntesis de TAG (Lu, *et al.* 2003).

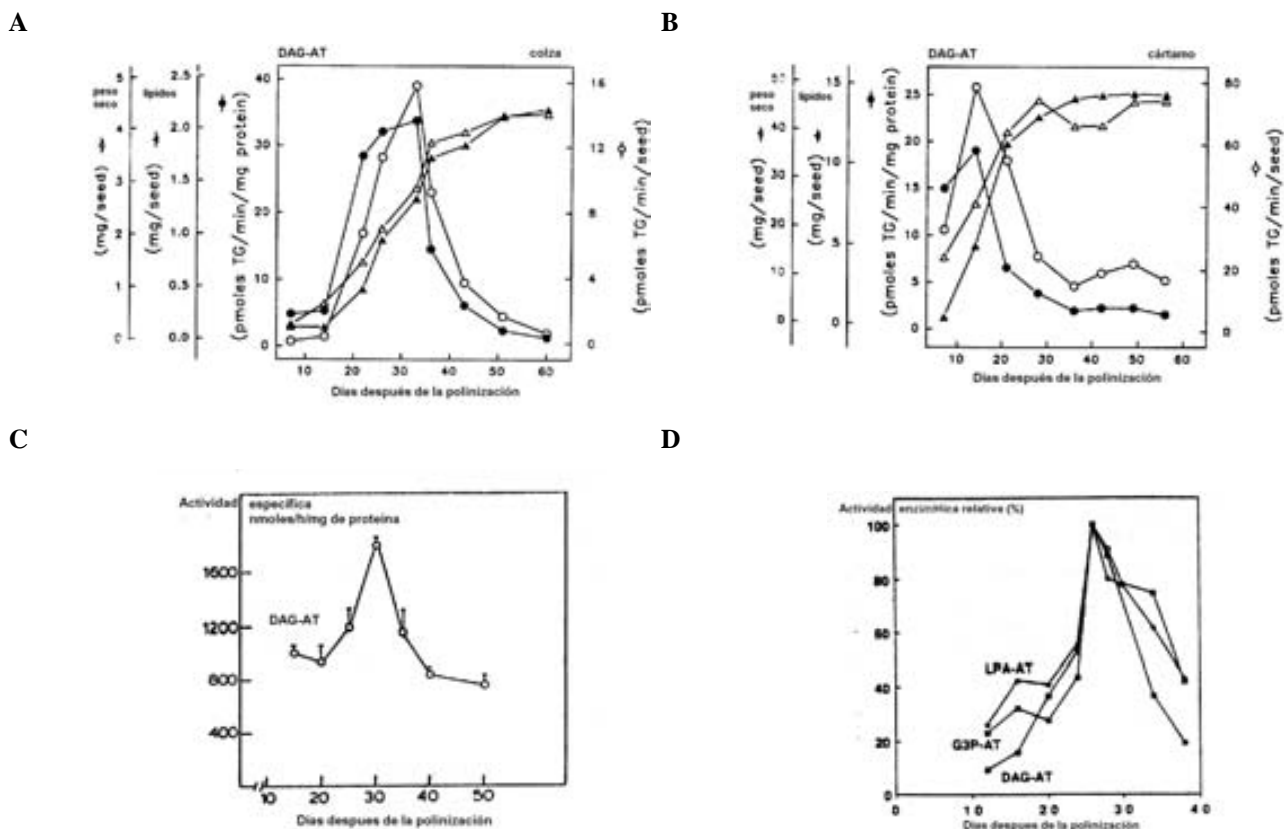


Figura 13. Actividad aciltransferasa, contenido de lípidos y peso seco en fracciones microsomales de semillas en desarrollo de colza (A y D); cártamo (B) y cacahuete (C). G3P-AT=glícero 3 fosfato aciltransferasa, LPA-AT=lisofosfatidato aciltransferasa y DAG-AT=diacilglícero aciltransferasa (Tomado de Sukumar, V. y Sastry, P., 1987; Weselake *et al.*, 1993, Little *et al.*, 1994 y Tzen *et al.*, 1993).

También se ha encontrado a la DAG-AT asociada a las membranas de cloroplastos de hojas en senescencia. Las hojas en desarrollo y las senescentes de *A. thaliana* expresan la secuencia E6B2T7 que codifica para la DAG-AT. Estas hojas acumulan TAG característicos de galactolípidos del tilacoide (ricos en ácido hexadecatrienoico y ácido linoléico). Se propone que esta enzima secuestra a los FA que son liberados del catabolismo de galactolípidos del tilacoide en los TAG de hojas. Estos hallazgos parecen ser un paso intermediario entre la conversión de los FA del tilacoide en la sacarosa del floema durante la senescencia de las hojas (Kaup, *et al.*, 2002).

2.5.3 El uso de detergentes en la purificación de la DAG-AT de diferentes tejidos

El conocimiento de la DAG-AT deriva del estudio de preparaciones microsomales crudas o de fracciones solubilizadas con diferentes detergentes a pesar de que su uso inhibe a veces la actividad. Por ejemplo, la solubilización de DAG-AT con colato de sodio redujo la actividad específica en microsomas intestinales y de hígado de rata (Manganaro y Kuksis, 1985 y Polokoff y Bell, 1980). También se inhibe la actividad con tritón X-100 con una concentración a más de 100 veces o por debajo de la concentración micelar crítica (cmc) (Hosaka *et al.*, 1977; Bell y Coleman, 1983). Si se utiliza octil-glucopiranosido o tween-20 se recupera entre el 2 y 5 % de la actividad.

En el caso de las semillas de cártamo, la DAG-AT se inhibe fuertemente con 0.1% de deoxicolato de sodio (Ichihara y Noda, 1982). En microsomas de soya se observó pérdida de la actividad con otros detergentes iónicos y no iónicos, como tritón X-100, tween-80, nonidet P-40, colato y deoxicolato de sodio. También la DAG-AT se ha purificado a homogeneidad con CHAPS; sin embargo, se disminuye la actividad específica de la enzima. En esta preparación se recupera solamente el 10% del total de la proteína aplicada además de que se encontraron glicerolípidos asociados (Kwanyuen y Wilson, 1986). Weselake y colaboradores (1991), usando el detergente MEGA-8 dispersaron a la DAG-AT a partir de un extracto de células de colza en suspensión. Con este mismo detergente se pudo solubilizar a la DAG-AT en una fracción no particulada de microsomas de colza (Little *et al.*, 1994).

En la mayoría de los casos, si se remueve el exceso de detergente mediante diálisis se aumenta la estabilidad de la enzima, pero se incrementa la turbidez de la solución y la actividad se sedimenta por ultracentrifugación. Varios de los intentos de solubilización de la DAG-AT mostraron que ésta permanece asociada a lípidos de membrana y a otras aciltransferasas (DAG-colina fosfotransferasa, MAG-AT, G3P-AT y LPA-AT), además se observó la agregación a proteínas y la presencia de otras proteínas contaminantes. En el caso del tritón X-100 se observan grandes micelas de proteína-detergente-lípido y si esta preparación es deslipidada con acetona se produce la pérdida total de la actividad (Banerjee, *et al.*, 1995).

2.5.4 Características de DAG-AT y la expresión del gen en diferentes sistemas

El peso molecular de DAG-AT se estimó antes de la identificación de su gen. El peso de la enzima purificada de la bacteria *Mycobacterium smegmatis* en Sephadex G-100 es de 50 kDa (Akao y Kusaka 1976). En hígado de rata el tamaño funcional de la enzima es de 72,000 (Ozasa *et al* 1989) pero se ha sugerido que es un complejo multimérico con subunidades de 60 y 77 kDa (Anderson *et al.*, 1994). En el caso de tejidos vegetales, la enzima nativa de *B. napus* purificada en gel filtración pesa 2×10^6 (Little, *et al.*, 1994). También en filtración en gel, la DAG-AT en semillas de soya es un oligómero de cinco subunidades no idénticas de 41, 29 y 25 kDa que aparecen en una relación molar de 1:2:2, respectivamente (Tabla III). Debido a que la estructura nativa consta de diez multímeros idénticos acompañados de fosfolípidos, esta organización nativa fue estimada alrededor de los 1500 kDa, es decir, 20 veces más grande que el tamaño estimado en hígado de rata (Kwanyuen y Wilson, 1990). En fracción microsomal del hongo oleaginoso *M. ramanniana* la enzima forma complejos multiméricos con subunidades de 24, 29 y 59 kDa (Kamisaka y Nakahara, 1994) y en LB se encontraron dos proteínas con actividad de DAG-AT con un peso de 36 y 36.5 kDa (Kamisaka, *et al.* 1997).

También el peso molecular de DAG-AT se estimó después de la identificación del gen (Tabla III). El cDNA del gen BnDGAT2 que codifica para los primeros 116 aminoácidos fue clonado y sobreexpresado en *Escherichia coli*. Es posible que se formen multímeros puesto que la masa molecular del polipéptido fue de 13,278 Da en filtración en gel (Weselake, *et al.*, 2004). De una biblioteca de cDNA de tejido adiposo humano se clonó una variante designada como DAGATsv. Esta secuencia expresa una forma truncada de DAG-AT inactiva pero estable para formar dímeros y tetrámeros con un peso de 108 kDa y de 214 kDa, respectivamente (Cheng, *et al.*, 2001). Basados en la secuencia de dos polipéptidos aislados de LB del hongo oleaginoso *M. ramanniana* se obtuvieron dos segmentos de cDNA llamados DGAT1A y DGAT2A. La masa

molecular calculada de los polipéptidos expresados en células de insecto fue de 36,000 y 40,602.5 Da (Lardizábal *et al.* 2001).

Tabla III. Características de DAG-AT obtenida de la purificación o de la expresión del gene de diferentes organismos.

Organismo	Peso Mole	Km (mM)	Actividad Esp $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}$	Inhibidores	Activadores	Comentario
<i>Zea mays</i>	100,000 ¹		0.11 ¹			gel filtración ¹
<i>Brassica napus</i>	2,000,000 ² 56,900 ³ 39,500 ³ 13,280 ⁴			bromooctanoato, CHAPS, tritón, deoxicolato de Na, tv glucopiranosido	BSA sacarosa sales flouradas ¹⁷ NaCl ¹⁷ CoA ¹⁷ ASP ⁴	gel filtración ² DGAT1, calculada de la secuen aminoácidos ³ DGAT2, calculada de la secuen aminoácidos ³ fragmento N-terminal, calculado de la se de DNA ⁴ inhibición ⁵
<i>Glycine max</i>	1,843,000 ⁵ 1,539,000 ⁶	0.006 ⁷ 0.11 ⁷ sust 1,2-dioleín	0.00292 ⁷	deoxicolato de Na ⁷		purificada a homogeneidad con gel fi monómero de 5 subunidades (x*40 2x*28,700 + 2x*24,500). La enzima nat compuesta de 10 monómeros idénticos ⁵ gel filtración, enzima deslipidada li fosfolípidos ⁶
<i>Mortierella ramd</i>	53,000 ⁸ 40,600 ⁹ 39,600 ⁹ 36,000 ⁹		3.3 ⁸ 2.63 ⁹	CaCl ₂ , KCl, MgCl ₂ , esfingosina, trifluoperaz	ácido fosfatídico fosfatidilderina ¹⁹	SDS-PAGE ⁸ se inhibe solamente la enzima purificada ⁸ DGAT1A, calculado de la secuen aminoácidos ⁹ DGAT2A, calculado de la secuen aminoácidos ⁹ SDS-PAGE ⁹
<i>Mus musculus</i>	47,000 ¹⁰ 44,500 ¹¹		0.16 ¹¹	MgCl ₂ ¹⁰	glucosa ¹⁰ insulina ¹⁰	SDS-PAGE ^{10 y 11}
<i>Rattus norvegicu</i>	60,000 ¹² 72,000 ¹⁶		0.83 ¹²	dipalmitina, LPC, hexanol, butanol, dioxano, DTT, etanol, ácido dinitrobenzoico, a	BSA, LPC, y PC	SDS-PAGE ¹² análisis de la inactivación por radiación i para determinar su tamaño funcional <i>in situ</i>

Tabla III. Continuación.....

Organismo	Peso Molec	Km (mM)	Actividad Esp $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}$	Inhibidores	Activadores	Comentario
<i>Homo sapiens</i>	150,000 ¹³		0.0035 ¹³	DTT, MgCl ₂ 1-O-hexadecil-2-oleoil- glicerol ¹⁴	ASP ^{18y19}	gel filtración. Enzima tetramérica (4*50,00 inhibición competitiva ¹⁴
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	50,000 ¹⁵	0.01 ¹⁵ 0.006 ¹⁵		deoxicolato, N-etilma SDS, ácido 2- nitrobenz		gel filtración ¹⁵ sustrato 1,2-dioleína ¹⁵ palmitoil-CoA ¹⁵ gel filtración ¹⁷

1 En este trabajo

2 Little, *et al.*, 1994

3 Nykiforuk, *et al.*, 2002

4 Weselake, *et al.*, 2000

5 Weselake, *et al.*, 1991

6 Kwanyuen y Wilson, 1990

7 Kwanyuen y Wilson, 1986

8 Kamisaka, Y, *et al.*, 1997

9 Lardizabal, *et al.*, 2001

10 Cases, *et al.*, 1998b

11 Cases, *et al.*, 2001

12 Andersson, *et al.*, 1994

13 Cheng, *et al.*, 2001

14 Kawasaki y Snyder, 1988

15 Akao y Kusaka, 1976

16 Osaza, *et al.* 1989

17 Byers *et al.*, 2000

18 Cianflone, 1997

19 Baldo, *et al.*, 1993

20 Lozaman, 1995

La identificación del gene de la DAG-AT fue imprevista. Se crearon varios mutantes de *A. thaliana* con un patrón alterado de la biosíntesis de FA. Entre ellos, el mutante AS11 tiene asimismo disminuida la actividad DAG-AT y la acumulación de TAG durante el desarrollo de la semilla (Katavic, *et al.*, 1995). Varios años después se demostró que este mutante tiene una lesión en el alelo AS11 del gene TAG1 que codifica para la DAG-AT localizado en el cromosoma dos (Fig. 14; Routaboul *et al.*, 1999). También se identificó el alelo ABX45 (Fig. 14) utilizando el cDNA que codifica para la DAG-AT de ratón (Fig. 14b; Bouvier-Navé, *et al.*, 2000a). Ambos mutantes no muestran un fenotipo especial. A su vez, se clonaron los genes homólogos en otros tejidos vegetales. Por ejemplo, se aislaron dos cDNA que codifican para proteínas con actividad de DAG-AT en la planta de olivo (Giannoulia, *et al.*, 2000) y en células en suspensión de *B. napus* (Nykiforuk *et al.* 1999). En animales, se expresó una secuencia tag de cDNA de ratón en células H5 de insecto designada como A-3. La síntesis de TAG se incrementó considerablemente, por lo que se concluyó que esta secuencia codifica para la subunidad catalítica de la DAG-AT (Cases, *et al.*, 1998b). Posteriormente se encontró un segundo gene de la DAG-AT (el DGAT2) en hígado y tejido adiposo. La síntesis de TAG y la expresión de DAG-AT no se afectan si se interrumpe este gene demostrándose la posibilidad de la existencia de un mecanismo alternativo de formación de TAG (Cases, *et al.*, 2001).

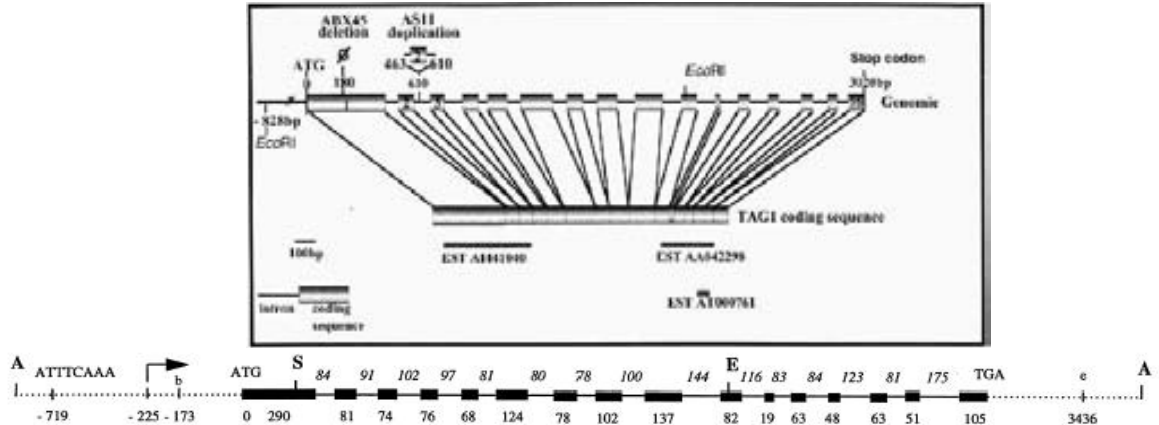


Figura 14. Organización del gene que codifica para la DAG-AT de *Arabidopsis thaliana*. Se muestran los intrones (línea), las secuencias codificantes (sombas) y la posición de las mutaciones AS11 y ABX45. La parte del gene de la región codificante (3020 bp) contiene 16 exones y 15 intrones. Los exones se muestran como una línea gruesa y los intrones como una línea delgada continua. Partes del gene por debajo y arriba de la región codificante se muestran como líneas punteadas. Los números bajo los exones y sobre los intrones son pares de bases (bp). El motivo ATTTCAAA a -719 bp es un posible sitio EREE. Las flechas indican el punto de traducción según Hobbs *et al.*, 1999. S, E, A: *Sac*I, *Eco*RI, *Ase*I. Las letras b y e marcan el extremo 5' y 3' del cDNA (3D71) (Tomado de Routaboul *et al.*, 1999 y Bouvier-Navé, *et al.* 2000a)

La sobreexpresión del gene TAG1 de *A. thaliana* estimula la síntesis de TAG y aumenta el tamaño de las semillas en desarrollo (Jako, *et al.* 2001). Además se expresa en semillas en germinación, raíces, hojas, flores y en silicuas (Zou *et al.*, 1999). En la planta de tabaco la sobreexpresión del gene se localiza también en hojas (Bouvier-Navé *et al.*, 2000a) mientras que en el olivo es en semillas en desarrollo, flores, hojas y granos de polen maduros (Giannoulia, *et al.*, 2000). Estos antecedentes son inconsistentes con la idea de que DAG-AT solamente se encuentra en los tejidos de la planta capaces de acumular TAG. La síntesis de TAG y el aumento de la actividad de DAG-AT se incrementó en *Saccharomyces cerevisiae* transformado con el cDNA del nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Bouvier-Navé, 2000b).

Las secuencias de las proteínas derivadas de la expresión de los genes que codifican para la DAG-AT predicen los segmentos transmembranales y los posibles segmentos hidrofóbicos e hidrofílicos. Por ejemplo, el alelo AS11 de *A. thaliana* predice una proteína con 7 a 9 segmentos transmembranales (Routaboul *et al.*, 1999) pero expresado en ratón codifica para una proteína con 10 segmentos hidrofóbicos (Zou *et al.*, 1999) y uno hidrofílico de 14 kDa en el extremo amino (Hobbs *et al.*, 1999). La proteína del gene TAG1 de *A. thaliana* expresada en hojas de tabaco presenta diez segmentos hidrofóbicos en los 520 aminoácidos (59 kDa) que la conforman (Bouvier-Navé *et al.*, 2000a). El polipéptido del gene BnDGAT1 tiene nueve segmentos transmembranales y se sugiere que la región N-terminal forma parte de un asa hidrofílica citosólica (Weselake, 2004). Si se compara la secuencia de aminoácidos de las proteínas de DAG-AT del nemátodo *C. elegans* con la de *A. thaliana* coinciden en los 10 segmentos hidrofóbicos entre los aminoácidos 382 al 401 y una región hidrofílica entre los residuos 65 y 100 en el segmento N-terminal (Bouvier-Navé, 2000a y b). La secuencia A-3 que codifica para la proteína de DAG-AT de ratón tiene entre 6 y 12 segmentos hidrofobos (Cases *et al.*, 1998b).

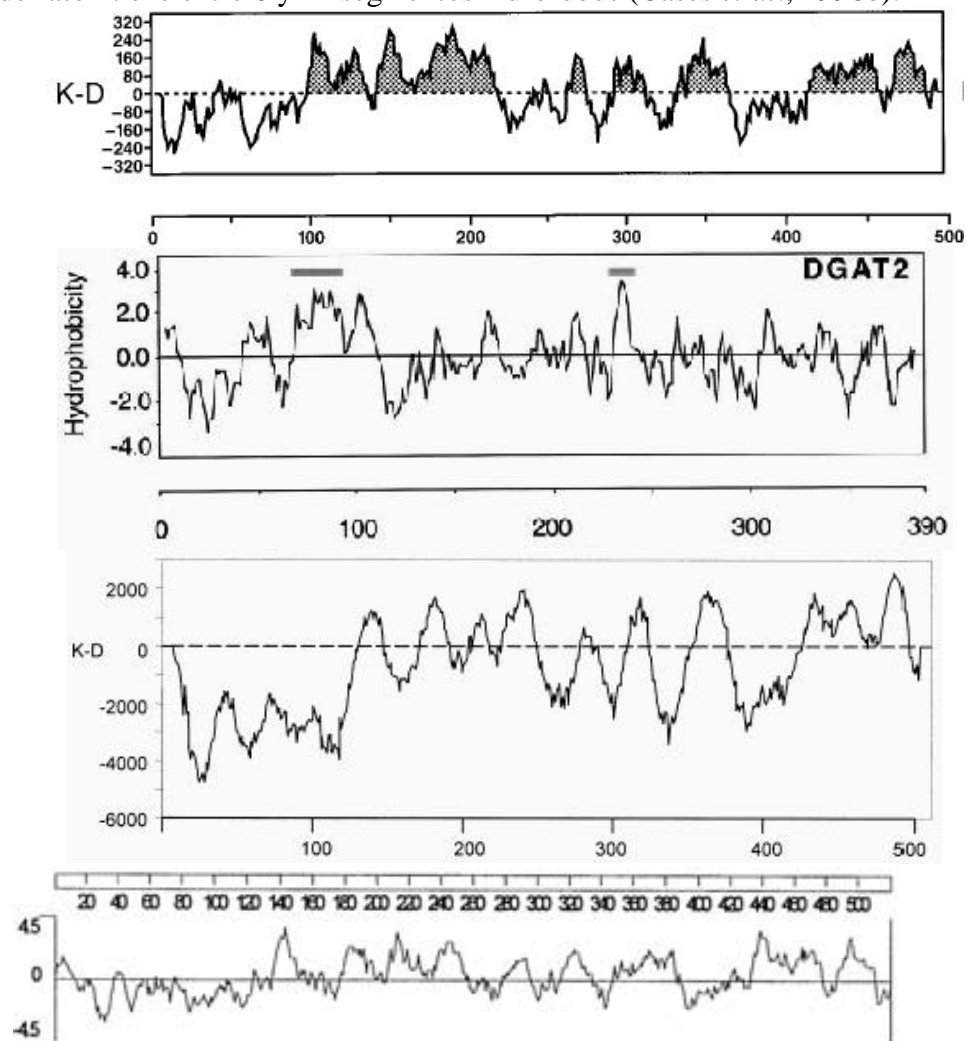


Figura 15. Gráficas de hidrofobicidad de DAG-AT por análisis Kyte-Doolittle. De la secuencia A-3 de ratón expresada en células H5 de insecto (A), de la expresión del gene DGAT2 de ratón (B), del gene que codifica para la DAG-AT de *A. thaliana* (C) y del polipéptido derivado del gene TAG1 de *A. thaliana* (D). Los segmentos hidrofóbicos tienen valores positivos. Las barras indican probables dominios hidrofóbicos. (Tomado de Cases *et al.*, 1998b y 2001; Hobbs *et al.*, 1999 y Zou *et al.* 1999 respectivamente).

Las proteínas de una amplia y diversa superfamilia de aciltransferasas asociadas a membrana comparten regiones muy similares. Las secuencias tienen típicamente de 8 a 10 segmentos transmembranales. Estas proteínas comparten una región de residuos polares altamente conservados (Figura 16). En la región hidrofóbica se encuentra una histidina conservada lo que sugiere que ahí se encuentra localizado el sitio activo de estas enzimas (Hofman, 2000).



Figura 16. Alineamiento múltiple de una región conservada en la familia MBOAT (Membrane-Bound O-Acyltransferases). Las especies y los nombres de las enzimas son abreviados: AT, *Arabidopsis thaliana*; BS, *Bacillus subtilis*; CE, *Caenorhabditis elegans*; DM, *Drosophila melanogaster*; HS, *Homo sapiens*; MM, *Mus musculus*; PA, *Pseudomonas aeruginosa*; SA, *Staphylococcus aureus*; SC, *Saccharomyces cerevisiae*; SI, *Simmondsia chinensis*; TP, *Treponema pallidum*; ACAT, *Colesterol aciltransferasa*; DGAT, *Diacilglicerol O-aciltransferasa*; WaxSyn, *Cera sintasa*. Residuos invariables y sustituciones conservativas en >50% de las secuencias se muestran en negro y gris, respectivamente. ■ residuos polares altamente conservados, ★ residuo de histidina en el centro activo. Los números de la izquierda del alineamiento indican la posición en la secuencia, la barra negra arriba indica una gran región hidrofoba (Tomado de Hofmann, 2000).

2.5.5 Especificidad y selectividad por su sustrato

En semillas en desarrollo de cártamo, *Brassica rapa* y cacao los acyl-CoA con FA (6-18 carbonos) saturados e insaturados son sustratos de DAG-AT (Hosaka *et al.*, 1977; Bell y Coleman, 1983; Ichihara *et al.*, 1988; Murphy *et al.*, 1993 y Little *et al.*, 1994). La DAG-AT incorpora eruciato preferentemente en la posición *sn*-3 en semillas de colza (Taylor *et al.*, 1991 y 1992), mientras que en semillas de ricino y *Crepis palestina* hay una especificidad por el ácido ricinoléico y vernólico (Dahlqvist, *et al.*, 1998). La DAG-AT de semillas de maíz actúa preferentemente sobre linoleoil-CoA, palmitoil-CoA y oleoil-CoA y es prácticamente inactiva con erucoil-CoA como sustrato (Cao y Huang, 1987). En semillas de colza la DAG-AT tiene una amplia especificidad para otros DAG excepto para los DAG solubles en agua como el 1,2-diacetilglicerol y 1,2-dibutirilglicerol (Ichihara y Noda, 1982). En el caso de la DAG-AT de hígado de pollo se ha observado que el *sn*-1,2-diacilglicerol se acila preferentemente sobre el *sn*-2,3-diacilglicerol (Weiss *et al.*, 1960).

Desde 1960, cuando Weiss y colaboradores describieron por primera vez a la DAG-AT, notaron en las partículas enzimáticas la presencia de DAG endógenos. Así mismo, se reportó que hay una actividad apreciable de esta enzima en ausencia de DAG adicionados. También, Ichihara y Noda (1982) confirmaron que la enzima utiliza los 1,2-DAG endógenos presentes en las preparaciones de partículas subcelulares de cártamo cuando el dioleoilglicerol es omitido de la mezcla de reacción. La DAG-AT prefiere utilizar el DAG endógeno como sustrato sobre la dierucina agregada exógenamente en *Brassica oleracea* (Taylor *et al.*, 1995). Estudios anteriores también indican una alta incorporación de acyl-CoA en aceptores endógenos aún en la presencia de *sn*-1,2-dioleína exógena (Weselake, 1991). En fracciones crudas y particuladas de colza, varios 1,2-DAG endógenos fueron utilizados como acil aceptores para formar TAG (Weselake, *op cit*; Taylor *et al.*, 1992) y al igual que en microsomas de escutelo de maíz, la actividad de la DAG-AT fue parcialmente dependiente de la adición de dioleína externa (Cao y Huang, 1986). En el hongo oleaginoso *M. ramanniana* la DAG-AT también puede utilizar DAG endógeno (Pillai *et al.*, 1998). En este mismo sentido, se ha observado que aún cuando se adiciona el sustrato en forma de micelas (emulsificado con tween 20) la actividad no se estimula significativamente en partículas lipídicas de *S. cerevisiae* (Christiansen, 1979), en fracciones solubilizadas de embriones de colza (Little, 1994; Byers *et al.*, 1998) y en el hongo oleaginoso *M. ramanniana* (Kamisaka y Nakahara, 1996). Los acyl-CoA pueden ser limitantes para la actividad de la DAG-AT, dada la abundancia de DAG endógeno (Perry y Harwood, 1993b).

2.5.6 Factores que afectan la actividad de la DAG-AT

Se han estudiado varias condiciones en el ensayo de la actividad de DAG-AT. La actividad de DAG-AT se estimula con Mg^{2+} en hígado de pollo, de rata, en espinaca, palma y colza (Weiss *et al.*, 1960; Polokoff y Bell, 1980; Martin y Wilson, 1984; Oo y Chew, 1992; Byers *et al.*, 1998) pero se inhibe en levadura y en girasol (Christiansen, 1979; Ichihara y Noda, 1982). El DTT incrementa la actividad en hígado de rata (Tabla III, Hosaka *et al.*, 1977) pero no tiene efecto en maíz y girasol (Ichihara y Noda, 1982; Cao y Huang, 1986). La presencia del ácido eicopentaenoico en el medio de reacción reduce la actividad de la DAG-AT en hígado de ratón (Rustan, *et al.*, 1988).

La actividad de la DAG-AT de animales tiene mecanismos de fosforilación y desfosforilación. La DAG-AT de microsomas de hígado de rata es activa en estado desfosforilado. Se demostró que la DAG-AT incubada con $MgCl_2$, adenosina-5'-trifosfato (ATP) y fluoruro (inhibidor de la fosfoproteína fosfatasa) es menos activa; posteriormente se reactiva si se incuba con la fracción citosólica con DTT (Haagsman *et al.*, 1982 y Bell y Coleman, 1983). En tejido adiposo de rata se demostró la inactivación de la DAG-AT con ATP en un extracto citosólico y la activación con una proteína-fosfatasa de hígado de rata (Rodríguez *et al.*, 1992). En fibroblastos se sugiere que la forma activa de DAG-AT es la fosforilada. La actividad específica de esta enzima se incrementa tres veces en células tratadas en presencia de N-6,2'-O-dibutyryl-cAMP (DBcAMP) y de fluoruro (Lau y Rodríguez, 1996). Una estimulación similar por cAMP se observó en células del endotelio de bovino, sin embargo, un tratamiento similar en hepatocitos de rata produjo una disminución de la actividad de la enzima (Lehner y Kuksis, 1996).

2.5.7 Inhibidores de la actividad de DAG-AT

Existen diversos inhibidores de la actividad de DAG-AT (Tabla III). El 2-bromooctanoato actúa como un inhibidor competitivo de la actividad de DAG-AT de hígado de rata con una K_i de 1.5 μM . La K_m fue de 25 μM para el sustrato palmitoil-CoA (Mayorek y Bar-Tana, 1985). También en microsomas de colza la actividad de DAG-AT se inhibe con 2-bromooctanoato a 1.5 μM (Weselake *et al.*, 1991).

Las amidepsinas A, B, C, D y E (Fig. 17a) se aislaron del hongo *Humicola sp.* inhiben la actividad de DAG-AT de hígado de rata con un valor de IC_{50} de 10.2, 19.2, 51.6, 17.5 y 124 μM respectivamente, (Tomoda *et al.*, 1995a, 1995b y 1996). También se demostró una inhibición *in vivo* de ésta actividad en células intactas Raji.

Los metabolitos fungales de *Gliocladium roseum* muestran un claro efecto inhibitorio en la actividad de DAG-AT con un IC_{50} entre 15 y 22 μM . Estos metabolitos, llamados roselipinas tienen una estructura compuesta por tres partes; un ácido graso (C20) altamente metilado, una hexosa (manopiranosida) y un alditol (arabinitol). Las roselipinas 2A, 2B, 1A y 1B (Fig. 17c) muestran un efecto citotóxico en células Raji (Tabata *et al.*, 1999 y Tomoda *et al.*, 1999).

Los productos llamados xantohumol (Fig 17b) en la planta *Humulus lupulus* inhiben la actividad de DAG-AT de hígado de rata. Estos compuestos, el A y el B, inhiben con un valor de IC_{50} de 50.3 y 194 μM , respectivamente (Tabata *et al.*, 1997). Los análisis cinéticos con respecto al sustrato palmitoil-CoA (gráficas Lineweaver y Dixon) muestran una K_m de 41 μM y una inhibición no competitiva con una de K_i 31 μM .

Recientemente se describieron dos poliacetilenos extraídos de un extracto etílico de *Panax ginseng*, una importante planta medicinal oriental: el (9R,10S)-epoxiheptadecano-4,6-diino-3-ona y el 1-metoxi (9R,10S)-epoxiheptadecano-4,6-diino-3-ona (Fig. 17e). Estos compuestos son inhibidores de DAG-AT de microsomas de hígado de rata con un IC_{50} de 9 y 32 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Seung *et al.*, 2004).

Los prenilflavonoides: calcona, kuraridina, kurarinol, kesenol y kusenol K extraídos de *Sophora flavescens* (Fig 17d) inhiben la actividad de DAG-AT con valores de IC_{50} de 10.9, 9.8, 8.6, 142.0 y 250 μM , respectivamente. La calcona fue el único compuesto que inhibió la síntesis de TAG en células Raji (Mi *et al.*, 2004).

Se conocen otros inhibidores de la actividad DAG-AT. Del fruto de la planta china llamada *Evodia rutaecarpa* -que se utiliza como droga que dilata los vasos para incrementar el flujo sanguíneo del cerebro y para efectos uterotónicos- se hizo un extracto metanólico en el cual se caracterizaron cuatro compuestos. Los alcaloides quinolónicos extraídos son conocidos como evocarpinos (Fig. 17f) inhiben la actividad de DAG-AT de microsomas de hígado de rata con los IC_{50} fueron de 69.5, 23.8, 20.1 y 13.5 μM (Ko, *et al.*, 2002).

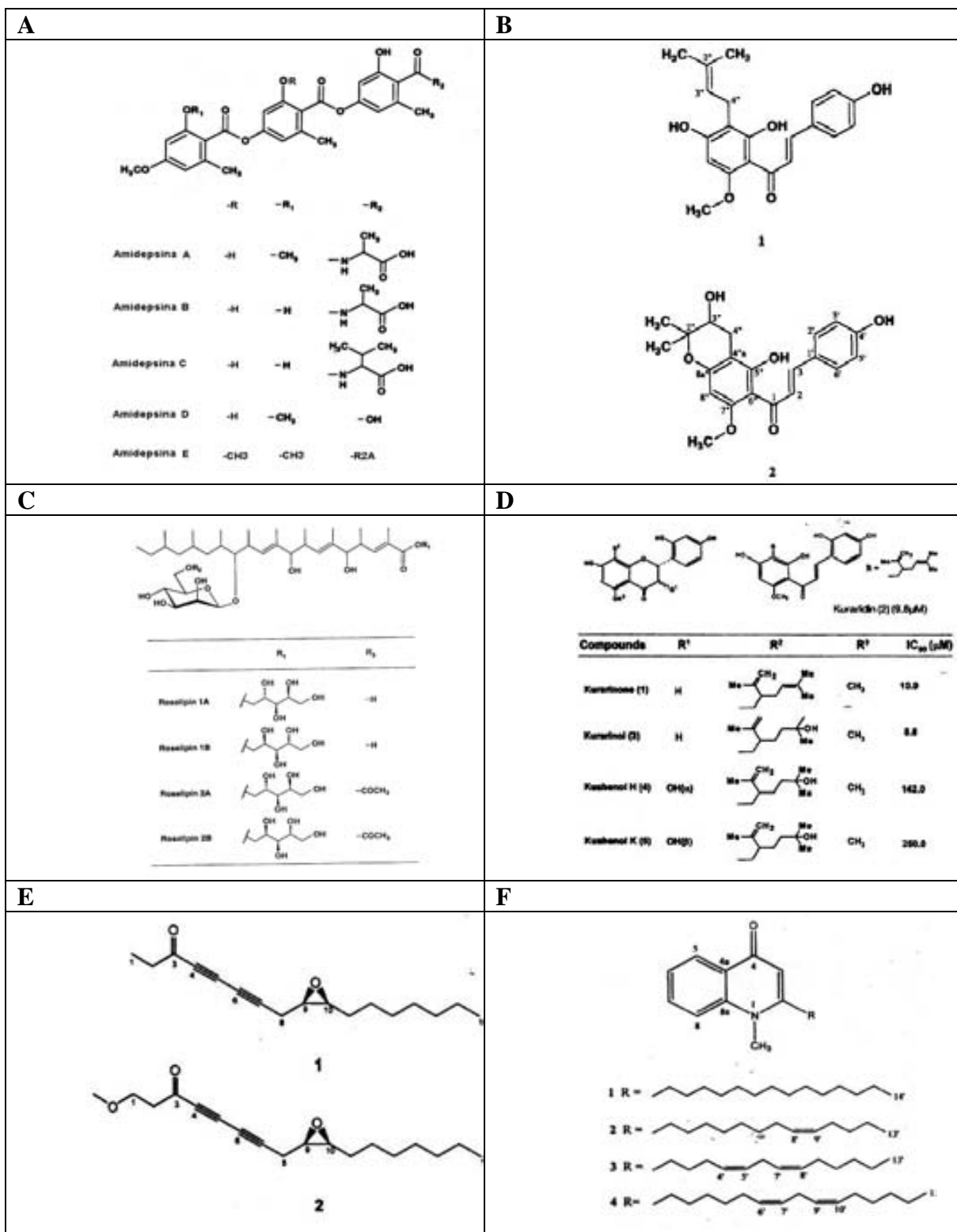


Figura 17. Inhibidores de la actividad DAG-AT. Amidepsinas A, B, C, D y E (ácido 2,4-di-O-metilgirofórico) producidos por *Humicola sp.* (A), xanthohumol A y B producidos por *Humulus lupulus* (B), roselininas 1A, 1B, 2A y 2B producidos por *Gliocladium roseum* KF-1040 (C), prenilflavonoides producidos por *Sophora flavescens* (D), poliacetilenos producidos por *Panax ginseng* (E) y alcaloides quinolones producidos por *Evodia rutaecarpa* (F) (Tomados de Tomoda *et al.*, 1995a, b, 1996 y 1999; Tabata *et al.*, 1997 y 1999; Seung *et al.*, 2004; Mi *et al.*, 2004 y Ko *et al.*, 2002, respectivamente).

2.6 Recapitulación de los antecedentes y justificación

La semilla de maíz es aprovechada en la industria alimentaria para la producción de aceites pero se desconocen las propiedades de las enzimas que participan en esta biosíntesis. Las semillas acumulan lípidos de reserva en la fase de expansión en el desarrollo de la semilla, los TAG son los más abundantes. Se conocen tres vías de la síntesis de TAG. La vía monoacilglicerol aciltransferasa se lleva a cabo en el intestino de mamífero y no ha sido localizada en plantas. La vía de Kennedy se localiza en el retículo endoplásmico de plantas, animales, levaduras, hongos y bacterias. Se ha propuesto que las enzimas y sus sustratos que participan en ésta vía (tres aciltransferasas y una fosfatasa específica) se encuentran en microdominios en donde se forman y secretan los cuerpos lipídicos llenos de TAG para su almacenamiento. La tercera vía de formación de TAG descrita en mucosa intestinal de rata y en semillas de girasol es la vía de la diacilglicerol transacilasa que por una acil transferencia entre dos moléculas de DAG forman TAG y MAG.

La DAG-AT tiene un papel central en el metabolismo de glicerolípidos. Es la única enzima que cataliza la acilación del 1,2-diacil-*sn*-glicerol (en la posición *sn*-3) para la formación de TAG en la vía de Kennedy. Sus sustratos son el DAG y los ácidos grasos (acil-CoA). El DAG también es utilizado por la CDPcolina: diacilglicerol fosfotransferasa para la formación de fosfatidilcolina. El DAG puede derivar de la hidrólisis del ácido fosfatídico producido a partir del glicerol-3-fosfato, alternativamente puede ser derivado de la esterificación del MAG y de la hidrólisis de TAG o fosfolípidos. En la actualidad el concepto de enzima clave o etapa limitante en el control del flujo de una vía metabólica es controversial, sin embargo muchos de los reportes acerca de la DAG-AT indican que esta enzima ejerce algún tipo de control en la vía de Kennedy. Las razones para sugerirlo son: que la actividad específica de la DAG-AT es la más baja en la vía en varias semillas en desarrollo y que el DAG es el sustrato limitante de la formación de TAG. No obstante, la escasez de uno de sus sustratos (acil-CoA) pudiera explicar la acumulación del otro (DAG).

Durante el desarrollo de la semilla de maíz hay una relación lineal entre el periodo de acumulación de TAG y la actividad de la DAG-AT. Esta actividad en tejidos vegetales se localiza en el retículo endoplásmico de semillas en desarrollo, sin embargo se encontró en hojas de espinaca y asociada a la membrana del cloroplasto en *A. thaliana*. El peso molecular de DAG-AT aislada con esquemas de purificación basados en el uso de detergentes varía desde los 53 hasta los 2000 kDa. Algunos reportes describen a la proteína monomérica con subunidades de diferente peso molecular otros proponen que la DAG-AT de humano es homotetramérica. Algunos otros plantean que la DAG-AT es un complejo de proteína asociada a lípidos; una explicación de la diferencia de los pesos moleculares reportados. Se han descrito también algunos inhibidores de la actividad. Entre éstos se encuentran varios detergentes como el deoxicolato de sodio, tween, SDS, CHAPS y el octilglucopiranosido. Inhibidores para la DAG-AT como el CaCl₂, el KCl, el MgCl₂, el HgCl₂; disolventes como el hexano o el butano; otros como el etanol, el ácido 2- nitrobenzoico, o la N-etilmaleimida.

La identificación del gene que codifica para la DAG-AT fue imprevista. El primer reporte fue la descripción de un mutante de *A. thaliana* con un patrón alterado de la biosíntesis de ácidos grasos que años más tarde se describió como el gen que codifica para DAG-AT llamado

TAG1. Otro grupo de investigadores se basaron en la secuencia de la ACAT para encontrar el de DAG-AT al que llamaron DGAT2. A partir de éstos se clonaron otros genes homólogos en diversos tejidos vegetales. Las secuencias de las proteínas derivadas de la expresión de los genes que codifican para la DAG-AT predicen entre 9 y 11 segmentos transmembranales. El peso molecular de las proteínas expresadas está alrededor de los 40 kDa.

La DAG-AT esta firmemente embebida en la membrana y su naturaleza hidrófoba no ha permitido usar un procedimiento de purificación adecuado. Se pierde la actividad cuando se hacen polvos de acetona de microsomas. Las fracciones recuperadas en el volumen de lavado después de una cromatografía de filtración en gel sugieren la presencia de micelas formadas con el detergente, con proteína y con lípidos. Además con este detergente se puede dispersar la DAG-AT pero después de una ultracentrifugación la enzima no está soluble. En varios reportes se presentan geles de electroforesis SDS-PAGE con varias bandas de las fracciones purificadas lo que impide identificar la banda a la que pertenece la DAG-AT.

Como ya se señaló, éstos estudios han sido limitados debido a la poca habilidad para purificar la DAG-AT. Los detergentes a menudo inhiben la actividad además, la pobre solubilidad en agua de los substratos y la asociación con otras aciltransferasas, cuerpos lipídicos, lipasas e hidrolasas en preparaciones parcialmente purificadas acarrea problemas y complica la interpretación de la cinética. Sin embargo, no se ha explotado el mecanismo por el cual se extraen los lípidos asociados a la enzima y no se ha logrado que se restablezca la actividad. El presente trabajo tiene la finalidad de desarrollar un método confiable para la medición de la actividad de DAG-AT, detallar algunas de las propiedades que son causales de su resistencia a la purificación y la reconstitución de la actividad.

3 HIPÓTESIS

La diacilglicerol aciltransferasa es una enzima membranal cuyo sustrato es totalmente liposoluble, por lo tanto, la asociación de la proteína con su sustrato estará limitado por la manera en que éste se encuentre distribuido en su entorno y a su vez tendrá influencia determinante en el ensayo de la actividad y en su purificación.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Purificar la enzima diacilglicerol aciltransferasa (DAG-AT) de embriones inmaduros de maíz.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desarrollar un método de medición en el que no se utilicen precursores radiactivos, confiable y con un límite de detección bajo para la actividad de la diacilglicerol aciltransferasa
- Determinar la actividad de la diacilglicerol aciltransferasa en fracciones microsomales crudas y solubilizadas de embriones en desarrollo y en cuerpos lipídicos de maíz
- Extraer los lípidos asociados a la enzima DAG-AT
- Restablecer la actividad DAG-AT de preparaciones deslipidadas

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

5.1.1 Sustancias químicas

Las sustancias radiactivas: el [^{14}C]-oleoyl-CoA y el [^{14}C]-acetato de sodio se obtuvieron de NEN Dupont. La oleoyl-CoA, el dipalmitoilglicerol, la dipalmitina, el ácido palmítico, el β -mercaptoetanol, la sacarosa, el MgCl_2 , el KCl, el NaCl, el PEG, el tris, el tween-20, el tween-80, el CHAPS, el Brij 35, el octilglucopiranosido, el MEGA-8, el PPEG-25, el SDS, el CTAB, el nonidet, el tritón X-114, el deoxicolato de sodio, el PPO, el POPOP, la lipasa, la lecitina de soya, el ácido bicinconínico, la MDH, el TEA, el acetyl-P, el malato de sodio, el NAD^+ y las sustancias químicas para electroforesis se obtuvieron de Sigma Chemical. El tritón X-100, la BSA, la PAT, la CS, y el cocktail de inhibidores de proteasas Complete[®] se obtuvieron de Boehringer Mannheim. El manitol se obtuvo de Mallinckrodt. La membrana de immobilon se obtuvo de Millipore. Las placas de gel de sílice, las mallas moleculares 3Å y 4Å de Aldrich. La PC, el yodo, el glicerol, el EDTA, el CaCl_2 , el benceno, la acetona, el cloroformo, el metanol, el ácido acético, la diisobutilcetona, el dietileter, el tetracloruro de carbono, el hexano, el ácido tricloroacético (TCA), el hidróxido de amonio, la urea y la arena de mar calcinada de Merck.

5.1.2 Material biológico

Los experimentos se realizaron con embriones inmaduros de dos variedades de maíz (*Zea mays* L.); el amarillo cristalino C5 y el chalqueño. Las semillas de la variedad amarillo cristalino se sembraron en el invernadero del departamento de Bioquímica, de la Facultad de Química de la UNAM. A estas plantas de ciclo corto se les polinizó manualmente después de la aparición de la inflorescencia masculina. Posteriormente, se obtuvieron los embriones en desarrollo de las mazorcas que se cosecharon entre los 21 y los 25 días después de la polinización. Debido a la necesidad de obtener continuamente suficiente material fresco se consiguió la variedad chalqueño de un mercado local. Los embriones inmaduros de esta variedad se obtuvieron de mazorcas frescas de acuerdo a su tamaño, a su morfología y el estado de los estilos que indicaban que los embriones tenían entre los 20 y los 25 días después de la polinización.

5.2 Métodos

5.2.1 Extracción de los embriones inmaduros de maíz

Las mazorcas de maíz se esterilizaron superficialmente 15 min con una solución de PEG 16%, p/v con hipoclorito de sodio 1%, v/v. Se enjuagaron con una solución estéril de PEG a la misma concentración. Los embriones inmaduros se extrajeron de la semilla con ayuda de una espátula y fueron colocados en una solución amortiguadora de tris 0.1 M, pH 7.4, manitol 0.6 M y sacarosa 30 mM. Finalmente, se pesaron y se molieron para obtener microsomas.

5.2.2 Preparación de la fracción microsomal

De los embriones inmaduros de maíz se obtuvo la fracción microsomal. Ocho gramos de embriones inmaduros de maíz entre 21 y 25 días después de la polinización se molieron en un mortero con 10 mL de amortiguador de tris-HCl 0.1 M, pH 7.4 previamente enfriado a 4°C, una pastilla de inhibidores de proteasas (Complete[®]) y arena de mar calcinada 0.1 g. Esta molienda se filtró a través de tres capas de gasa y se centrifugó a 10,000 x g 15 min (J2-21-Beckman) a 4°C. Al sobrenadante se le designó extracto crudo y la pastilla se descartó. El extracto crudo se centrifugó a 100,000 x g (Beckman XL-90) durante 60 min a 4°C. La pastilla obtenida se suspendió en el mismo amortiguador de molienda y se le nombró microsomas o fracción microsomal. Los microsomas se dividieron en alícuotas de 100 µL y se conservaron hasta por un mes a -70°C (Pacheco-Moisés 1997b).

5.2.3 Obtención de polvos de acetona

Los embriones inmaduros de maíz se molieron en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Se agregaron 50 mL de acetona previamente enfriada (-70°C) y nitrógeno líquido en una relación de 10:1 v/v, respectivamente. La suspensión obtenida se filtró con papel Whatman No. 1 en Buchner y se enjuagó con 50 mL de acetona. Se dejó secar a temperatura ambiente y los residuos de acetona se evaporaron bajo un flujo de nitrógeno hasta que la muestra tomó la apariencia de polvo. Los polvos se resuspendieron en amortiguador de tris-HCl 0.1 M, pH 7.4 y se obtuvo la fracción microsomal. En los polvos de acetona resuspendidos y en los microsomas derivados de éstos se determinó la cantidad de proteína y se ensayó la actividad DAG-AT.

5.2.4 Purificación de cuerpos lipídicos a partir de embriones maduros de maíz

Diez gramos de embriones maduros de maíz (de 35 días después de la polinización o más) se molieron en mortero con amortiguador de tris-HCl 50 mM, pH 6.8, y sacarosa 0.3 M. El homogenado se filtró con gasa y se centrifugó a 10,000 x g durante 20 min a 4°C (Beckman XL-90). La capa flotante de color blanco que contiene los LB fue recuperada y suspendida en amortiguador de tris-HCl 50 mM, pH 6.8, y urea 6 M. De nuevo se centrifugó y recuperó la fracción de LB. Repetidamente (hasta tres veces) la fracción fue resuspendida y centrifugada en amortiguador de tris-HCl 50 mM, pH 6.8, y NaCl 0.5 M. Al final los LB se resuspendieron en un volumen mínimo de agua y se mezclaron con metanol al 100% en una proporción de 1:10, v/v LB:metanol (Tzen *et al.* 1992 y 1993).

5.2.5 Análisis de lípidos

Se analizaron los lípidos extraídos con diferentes disolventes de fracciones microsomales y de los LB. Las muestras de los microsomas y los LB con disolventes se agitaron vigorosamente y se centrifugaron. El sobrenadante se extrajo y se evaporó con nitrógeno. Los lípidos extraídos se disolvieron en una pequeña cantidad de cloroformo y se aplicaron en placa de gel de sílice para su análisis por cromatografía en capa fina (TLC). las placas se desarrollaron hasta la mitad con cloroformo:metanol:ácido acético: agua (170:30:20:7, v/v). Después se dejó secar la placa y se desarrollaron hasta el final con: hexano:éter etílico:ácido acético (70:30:1, v/v). Los lípidos polares se separan en la primera mitad de la placa los neutros en la segunda mitad (Stobart *et al.*, 1997). En el caso del análisis exclusivo de lípidos neutros, la placa de gel de sílice se desarrolla en el sistema de disolventes hexano:éter etílico:ácido acético 80:20:1, v/v. Los fosfolípidos se revelaron con MoO₃ en H₂SO₄ y los lípidos neutros con vapores de yodo (Touchstone, 1992).

5.2.6 Cuantificación de la actividad DAG -AT. Método con radioisótopos

La actividad enzimática de la DAG-AT se estimó por la incorporación de radiactividad en los TAG (Cao y Huang, 1986). En el ensayo de actividad enzimática se utilizó el precursor radiactivo 1-[¹⁴C]oleoil-CoA (8 μ M que corresponden a 0.2 Ci/mL) y la 1,2-dipalmitina emulsificada con tween-20 (0.4 mM y 0.02% v/v, respectivamente). Además, la mezcla de reacción contenía MgCl₂ 2 mM, sacarosa 84 mM y amortiguador de tris-HCl 0.1 M, pH 7.4 (en 150 μ L totales). La reacción (a 30°C) se inició al agregar la proteína microsomal y se paró después de diez minutos con 600 μ L de cloroformo:metanol 1:1, v/v. La muestra se agitó vigorosamente y se centrifugó a 10,000 rpm durante cinco minutos. Se formaron tres fases: la clorofórmica, la intermedia de proteína y la acuosa. La fase clorofórmica (con los lípidos disueltos) se separó y se redujo al evaporarla con nitrógeno. Los lípidos se aplicaron en placas de gel de sílice para fraccionarlos con hexano:dietileter:ácido acético 80:20:1 v/v. Los lípidos se tiñeron ligeramente con vapores de yodo y los correspondientes a los TAG se rasparon de la placa. Finalmente, los TAG se colocaron en un vial con tres mililitros de líquido de centelleo y se registraron las desintegraciones por minuto (dpm) en un contador de centelleo líquido (Beckman LS 6000 1C).

5.2.7 Solubilización y purificación de la DAG -AT

Varios detergentes se utilizaron para solubilizar a la DAG-AT de la fracción microsomal. Primero, la fracción microsomal se separó el amortiguador en el que estaban suspendidos con centrifugación a 100,000 x g durante una hora (TL-100, Beckman) a 4°C. La pastilla se resuspendió en un amortiguador de solubilización en la proporción 2:1, amortiguador:proteína. El amortiguador de solubilización consistió de tris-HCl 0.1 M, pH 7.4, glicerol 20%, p/v, diferentes detergentes 1% p/v, con o sin NaCl 150 mM e inhibidores de proteasas. Los detergentes utilizados fueron los siguientes: no iónicos, el MEGA-8, el octilglucopiranosido, el tween-20, el tween-80, el brij 35, el nonidet, el tritón X-100, el tritón X-114 y el PPEG 25; aniónicos como el deoxicolato de sodio y el SDS; un zwitteriónico como el CHAPS y otro catiónico, el CTAB (ver anexo 1). La muestra de microsomas con el amortiguador de solubilización se sonicó a intervalos de 30 s durante 5 min a una frecuencia de 40 MHz en baño de hielo. Los microsomas resuspendidos se incubaron a 4°C en agitación constante durante 30 min. Finalmente, los microsomas se centrifugaron a 100,000 x g durante una hora para obtener la fracción solubilizada (sobrenadante) y la pastilla fue resuspendida en el mismo amortiguador de solubilización. Se midió la actividad de la DAG-AT en ambas fracciones.

Por otra parte se realizó un protocolo de purificación de la DAG-AT como lo señalan Kwanyuen y Wilson (1986). El extracto crudo extraído de embriones inmaduros de maíz se aplicó a una columna de DEAE Sephacel (Pharmacia Biotech). Inicialmente, la columna se eluyó con 30 mL de un amortiguador de tris-HCl 25 mM, pH 7.4, β -mercaptoetanol 15 mM y EDTA 1 mM. Posteriormente, la columna se eluyó con el mismo amortiguador y un gradiente de KCl hasta 0.1 M. Las fracciones eluidas con actividad de DAG-AT se centrifugaron a 100,000 x g durante una hora a 4°C y la pastilla obtenida se resuspendió en el mismo amortiguador con CHAPS 9 mM. Se centrifugó nuevamente a 100,000 x g por una hora para obtener la fracción solubilizada. Esta fracción se pasó por una columna de Sepharosa CL-4B con un gradiente de KCl hasta 1 M. A las fracciones eluidas de ésta última columna también se les midió la cantidad de proteína y la actividad de la DAG-AT.

Adicionalmente, se realizó un protocolo de purificación de la DAG-AT como lo indican Little y colaboradores (1994). A la fracción microsomal se le agregó un amortiguador que contenía el detergente MEGA-8 1 % p/v y NaCl 0.5 M (5:1 amortiguador:proteína). Luego, se obtuvo la fracción solubilizada al centrifugar a 100,000 x g durante una hora. El solubilizado se aplicó a una columna de filtración Superdex 200 HR120 (26x120 mm) en el sistema de FPLC a un flujo de 0.5 mL/min. Se eluyó con un amortiguador de tris-HCl 0.1 M, pH 7.4, MEGA-8 0.1% p/v, inhibidores de proteasas, NaCl 0.5 M, glicerol 20% v/v y DTT 1 mM. Las fracciones eluidas de la columna de filtración se les midió la cantidad de proteína y la actividad de la DAG-AT.

5.2.8 Tratamiento de fracciones microsomales y cuerpos lipídicos con disolventes

Las fracciones microsomales y los LB se trataron con disolventes para el análisis de la composición lipídica y para obtener proteína deslipidada. En el caso de las fracciones microsomales, el volumen equivalente de proteína microsomal entre 100 y 300 µg se liofilizó durante dos horas a -50°C. Enseguida, se le agregó 150 µL de benceno frío y se sonicó durante 15 min a 4°C (sonicador de baño FS 60 Fisher Scientific).

En el caso de los LB, a las fracciones con una cantidad de proteína entre 25 y 35 mg se les agregó un mL de benceno. Las fracciones fueron agitadas vigorosamente por unos segundos e incubadas durante cinco minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las fracciones derivadas de los LB y de las microsomales fueron centrifugadas a 10 000 rpm durante cinco minutos en una microcentrífuga. El sobrenadante se extrajo cuidadosamente con una jeringa y se analizó la composición lipídica en TLC; mientras, la pastilla fue evaporada con flujo de N₂. En total, este procedimiento se repitió hasta cuatro veces. Cuando se indica en el texto, el benceno fue sustituido por acetona, diisobutilcetona, dietileter, CCl₄, hexano o una mezcla de benceno:acetona (1:1, v/v). A las fracciones de microsomas y de los LB que resultan después de los tratamientos con disolventes, se le llamo proteína deslipidada.

5.2.9 Obtención de fosfatidilcolina deslipidada a partir de lecitina de soya

La lecitina de soya comercial usualmente contiene DAG por lo que fue necesario purificarla para eliminarlo. Cinco miligramos de lecitina de soya (Sigma Chemical Co.) fueron disueltos en 0.5 mL cloroformo. Luego, la lecitina fue aplicada en una línea de un mm de profundidad a lo ancho de una placa de TLC preparativa (200 mm x 200 mm x 2 mm). Posteriormente, la placa fue desarrollada con cloroformo:metanol:hidróxido de amonio al 28% en una relación de 65:35:5 v/v, respectivamente (Colowick y Kaplan, 1969). El carril correspondiente al estándar de PC fue expuesto a vapores de yodo. La PC -en la lecitina comercial- fue identificada y raspada de la placa. Al gel de sílice obtenida se le agregó cloroformo seco (con malla molecular 3Å) para extraer la PC. La PC purificada fue conservada a -70°C en solución de cloroformo.

5.2.10 Obtención del DAG radiactivo

Los DAG radiactivos se obtuvieron de la digestión de TAG marcados *in vivo*. Los TAG marcados con ¹⁴C se obtuvieron de embriones de maíz incubados con 2-[¹⁴C]-acetato de sodio (10 µCi). Primero, los embriones de maíz (15 a 20) fueron pre-incubados en un amortiguador de MES 5 mM, pH 5.5, sacarosa 30 mM, ácido abscísico (ABA) 1 µM y manitol 0.5 M durante 24 h. A continuación, se incubaron 12 h más con el medio mencionado y acetato radiactivo. Los embriones fueron exhaustivamente lavados con una solución de acetato de sodio 0.3 M. Posteriormente, los embriones fueron homogenizados en un mortero con 7 mL de una solución de

cloroformo:metanol 1:1, v/v con 200 mg de NaCl. A este macerado se le agregó 5 mL de una solución salina (NaCl 1% y ZnSO₄ 0.15%) y se agitó vigorosamente. Esta mezcla fue separada por centrifugación a 1,000 x g durante 5 min. La fase clorofórmica se conservó (a -70°C) para ser fraccionada en TLC y obtener los TAG radiactivos (ver apartado de análisis de lípidos). En este punto, los [¹⁴C]-TAG fueron digeridos para obtener los DAG. Primero, los [¹⁴C]-TAG se disolvieron en un mL de dietileter y se agregó 4 mL de amortiguador de trietanolamina-HCl 0.1 M, pH 7.4, y CaCl₂ 20 mM. Además se agregó 0.05 g de lipasa pancreática porcina y se incubó esta mezcla a 30°C (en un agitador orbital a 60 rpm) para digerir los [¹⁴C]-TAG. La reacción fue detenida -cuando la conversión de TAG a DAG fue del 15%- con la adición de 10 mL de cloroformo:metanol 1:1, v/v. Posteriormente, los DAG fueron separados en TLC (ver análisis de lípidos) y disueltos en cloroformo. Por último, el contenido molar de las DAG purificados fue determinado por el método descrito por Rodríguez-Sotres y Black (1993) y la radiactividad fue determinada por conteo en centelleo líquido.

5.2.11 Ensayo de la actividad de la DAG-AT en muestras deslipidadas y reconstituidas

Las fracciones de proteína deslipidada (derivada de microsomas o LB) fueron reconstituidas como se describe enseguida. Las fracciones de 0.2 mg de proteína deslipidada se les agregó DAG o con PC o con tween-20 disuelto en 0.2 mL de benceno. Luego, las fracciones fueron sonicadas a 20 MHz durante 30 s y evaporadas con nitrógeno. En este punto, a estas fracciones -una vez reconstituidas- se les midió la actividad de DAG-AT. Las concentraciones finales de DAG, PC y Tween fueron 0.3 mM, 15µg/mL y 0.02% respectivamente. En el ensayo de actividad enzimática se utilizó el precursor radiactivo 1-[¹⁴C]oleoil-CoA (30 µM) además, la mezcla de reacción del ensayo contenía MgCl₂ 2 mM, sacarosa 84 mM y el amortiguador Tris-HCl 0.1 M, pH 7.4, (0.15 mL totales). El acilaceptor fue el DAG que se incorporó en la reconstitución. Las reacciones se incubaron diez minutos a 30°C (en multiblock Lab-line) después de que fueran sonicadas a 20 MHz durante 30 s. Por último, la actividad enzimática de la DAG-AT se estimó por la incorporación de radiactividad en los TAG.

5.2.12 Filtración en gel usando una columna de vidrio poroso

Las fracciones proteicas deslipidadas (derivadas de las fracciones microsomales o de los LB) se resuspendieron en agua:metanol:ácido acético (1:1:1, v/v) a una concentración de 2.5 mg/mL y fueron congeladas a -20°C durante uno o dos días. Luego, las muestras fueron descongeladas y centrifugadas a 10,000 rpm en una microcentrífuga. Una muestra de sobrenadante (200 µL) fue inyectada y eluída en una columna de 13 mL de vidrio poroso 700 Å (2.6 X 630 mm) utilizando la misma mezcla de disolventes. Se monitoreó la absorbancia a 280 nm de las alícuotas. Las alícuotas con proteína se reconstituyeron como se mencionó en el apartado anterior con DAG y PC. Antes de ser reconstituidas, las alícuotas se secaron al vacío a 30°C. Las fracciones con proteína reconstituida se le midió la actividad DAG-AT.

5.2.13 Determinación de proteína

La concentración de proteína se determinó con el método del ácido bicinonínico (ver anexo 2) de acuerdo a Smith y col (1985). Se utilizó la BSA como proteína patrón o estándar. Luego, a 50 µL de las muestras o el estándar se les adicionó 0.8 mL de la mezcla del reactivo. Las muestras se incubaron durante 15 min a 60°C para desarrollar el color del complejo. Enseguida, se leyó la absorbancia a 562 nm en un espectrofotómetro Beckman modelo DU 640 y las absorbancias se ajustaron a un modelo lineal para la obtención de la concentración de proteína.

6 RESULTADOS

6.1 Diseño de un método de determinación de la actividad de la DAG -AT

La caracterización de las actividades de enzimas relacionadas con el metabolismo biosintético de lípidos, incluyendo a la DAG-AT, está restringida porque se requieren métodos con un límite de detección muy bajo ya que la actividad de muchas de éstas aciltransferasas es bastante baja. Por lo general, la actividad de la DAG-AT se determina como lo describieron Cao y Huang en 1986, con o sin modificaciones. Éste método (ver sección 5.2.6) emplea diversos donadores marcados como [^{14}C]-acil-CoA para cuantificar la incorporación de marca radiactiva en los TAG purificados de la fracción lipídica extraída del medio de reacción (Fig. 18a). Este método es laborioso, largo y costoso. Sin embargo, se puede cuantificar otro de los productos de la reacción (Fig. 18b) de la actividad aciltransferasa: la CoA libre.

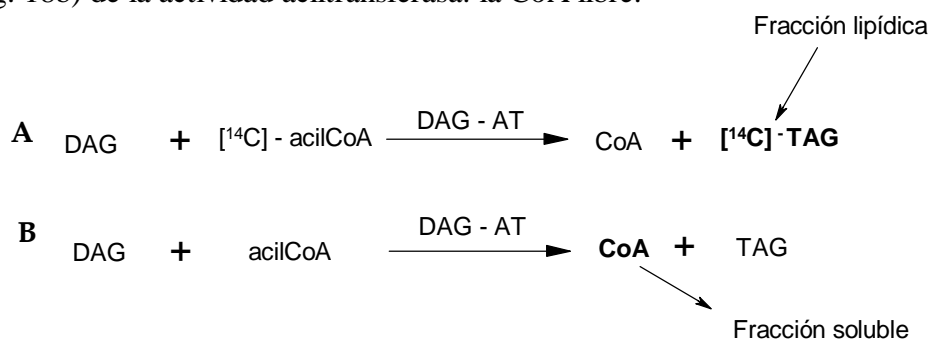


Figura 18. Medición de la actividad de DAG-AT por la cuantificación de sus productos en la fracción lipídica (A) o en la soluble (B). DAG= diacilglicerol, TAG= triacilglicerol, CoA= coenzima A, DAG-AT= diacilglicerol aciltransferasa.

En este trabajo, se reporta el diseño de un método con un límite de detección muy bajo para la medición de la actividad de aciltransferasa que cuantifica la CoA libre en la fracción soluble de la mezcla de la reacción. Éste método se basa en un ensayo enzimático que se usa extensamente en Química Clínica para la cuantificación de CoA (Michal y Bergmeyer, 1989), mismo que aquí se ha adaptado para la determinación de dicho producto en las actividades enzimáticas de las aciltransferasas. En este método se utilizan tres enzimas que se acoplan formando un ciclo de consumo y regeneración de CoA (Fig. 19). La actividad de la malato deshidrogenasa (MDH), se sigue espectrofotométricamente por la producción de NADH. Debido a que el equilibrio de la reacción catalizada por la MDH está desplazado hacia la formación de malato ($K_{\text{EQ}} = 1.3 \times 10^{-13}$), la aparición de NADH únicamente se observa si el oxaloacetato es consumido, lo cual ocurre más rápidamente si la concentración de acetyl-CoA es mayor. De esta manera, la concentración total de CoA disponible depende de la concentración de acetyl-CoA. Así, la rapidez del cambio de absorbancia (por la aparición de NADH) es una función de la cantidad añadida de CoA y acetyl-CoA. La producción de NADH se acopla como se describe a continuación:

La conversión de CoA a acetyl-CoA es catalizada por la fosfotransacetilasa (PAT) en presencia de acetyl fosfato (acetyl-P). La regeneración de CoA libre es catalizada por la citrato sintasa (CS) una vez provista del oxaloacetato que es generado *in situ* por la reacción de la MDH a partir de malato y NAD^+ . El malato, el NAD^+ , el acetyl-P y la CS se añaden en exceso para que la catálisis de la PAT sea de pseudo-primer orden (en ciertos límites de concentración de CoA añadida). Esto hace que la velocidad de consumo y regeneración de la CoA sea proporcional a la concentración de CoA presente en la muestra.

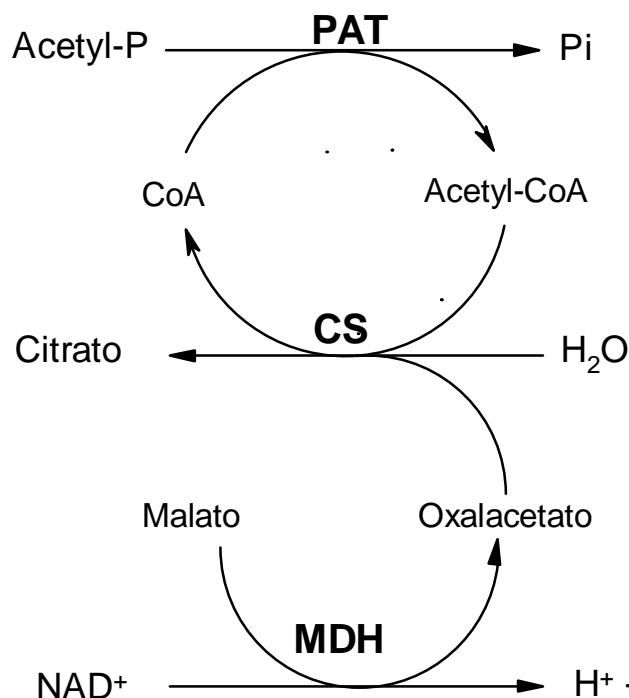


Figura 19. Método de cuantificación de CoA libre. Acetyl-P=acetil fosfato, Pi=fosfato, CoA=coenzima A, Acetyl-CoA=acetil CoA, CS=citrato sintasa, PAT=fosfotransacetilasa, MDH=malato deshidrogenasa (Tomado de Michal y Bergmeyer, 1989).

A partir de este momento, el método adaptado en este trabajo para la medición de la actividad de las aciltransferasas lo llamaremos método enzimático acoplado cíclico (MEAC). El medio de ensayo para éste método contiene la enzima PAT (20 U/mL) y su sustrato el acetyl-P (5 mM). Además, requiere de la CS (2.8 U/mL), la MDH (28 U/mL) y sus sustratos, malato de sodio (10.5 mM) y NAD⁺ (1.5 mM). El ensayo (0.5 mL de volumen final) se realiza a 30°C en un amortiguador de trietanolamina (TEA) 0.1mM, pH 8 y MgCl₂ 10 mM. El ensayo se inicia cuando se agregan 100 µL de la fracción soluble del medio de reacción de la DAG-AT, muestra cuya concentración de CoA se desea conocer. La reacción se sigue por el cambio de absorbancia en función del tiempo en un espectrofotómetro (Beckman 640) a 340 nm.

Las diferencias entre los métodos de medición de la actividad DAG-AT con radioisótopos y el MEAC se observan en la Figura 20. El medio de reacción en ambos métodos es el mismo excepto que el método con radioisótopos requiere de precursores marcados. La reacción enzimática de la DAG-AT produce TAG y CoA (Fig. 18) y se interrumpe cuando se agrega una mezcla de cloroformo-metanol al medio de reacción. En este punto, el medio de reacción se separa en dos fases, una orgánica y otra acuosa, después de una centrifugación. En una alícuota de la fase acuosa se cuantifica la cantidad de CoA directamente en un espectrofotómetro con el MEAC, mientras que para el método con radioisótopos, los TAG radiactivos tienen que ser separados de otros lípidos contenidos en la fase clorofórmica para cuantificarlos. Como se observa en la Figura 20, el método con radioisótopos requiere de varios pasos laboriosos y demanda mucho más tiempo para conocer la actividad de la DAG-AT que el MEAC el cual solamente requiere de algunos minutos adicionales.

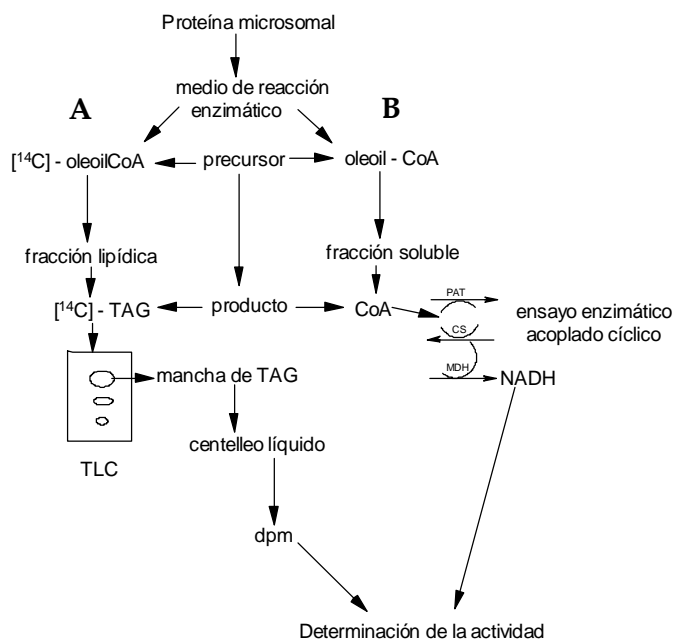


Figura 20. Comparación del método con precursores radiactivos (A) y el MEAC (B) para la determinación de la actividad DAG-AT.

Un aspecto a considerar del MEAC es la hidrólisis no enzimática del tioéster presente en el sustrato donador de acilos. Aunque no es muy extensa sí es detectable. Entonces, fue muy importante elegir alguna forma de parar la reacción enzimática de DAG-AT con un método que evitara la hidrólisis no enzimática del acyl-CoA, además de conservar a la CoA íntegra. También, fue deseable que el método involucrara tan poca manipulación como fuera posible. Los métodos que se probaron fueron la incorporación de disolventes, la acidificación y el calentamiento a 90°C del medio de reacción. Como se observa en la Tabla IV, la reacción de la DAG-AT se paró con una mezcla de cloroformo-metanol, con ácido tricloroacético, (1 mM) y con HCl (10 mM). No se consideró adecuado detener la reacción con HCl debido a que se recuperó una menor cantidad de CoA ni con calentamiento puesto que la DAG-AT puede recuperar su actividad después de 5 minutos cuando se enfría la muestra (Tabla IV). Adicionalmente, se ensayó la actividad de DAG-AT en presencia y ausencia de 2-β-mercaptoetanol, 1 mM. Debido a la posibilidad de que la presencia de éste tiol favoreciera la transacilación de la oleoil-CoA con liberación del CoA se ensayó la actividad y se detuvo con cloroformo:metanol 3:1. Los resultados muestran que la presencia de tioles libres en el ensayo de la DAG-AT no afecta la recuperación de CoA. Finalmente, es posible restar su interferencia realizado un blanco en el que la enzima se añade después de cloroformo-metanol.

TABLA IV. Actividad específica (nmol min⁻¹ mgprot⁻¹) de DAG-AT. La actividad se paró con los diferentes métodos indicados en la tabla, posteriormente una parte de la fracción soluble de la mezcla de reacción de la actividad DAG-AT se agregó al MEAC y se detectó la aparición de NADH. En el blanco la proteína microsomal se agregó al final de cada tratamiento.

Ensayo	TCA (1mM)	HCl (10mM)	hervir a 90°C	cloroformo:metanol 3:1	cloroformo:metanol + β-mercaptoetanol
1	53.62	31.49	49.46	52.71	52.61
2	51.09	25.39	54.05	55.31	53.34
3	54.81	25.99	51.30	53.46	52.45
Blanco	2.36	4.25	51.30	2.54	5.13

La actividad de las enzimas acopladas es sensible a las pequeñas variaciones experimentales ya que modifican la relación entre concentración de CoA y velocidad de producción de NADH. Por consiguiente, cada ensayo debe ser estandarizado con una curva patrón de CoA. Las concentraciones de CoA y de acyl-CoA se determinaron con los coeficientes de extinción a 257 sobre absorción a 232 nm reportados por Steadman (1953) mediante espectrofotometría UV. Estos valores son de ϵ_{257} (CoA tiol libre)= $16480 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, A_{257}/A_{232} (CoA tiol libre)= 3.92 y A_{257}/A_{232} (tioésteres de CoA)= 1.89. También, se debe de tomar en cuenta que las trazas de CoA libre que vienen como contaminantes del sustrato de la DAG-AT dan lecturas positivas (debido a la elevada sensibilidad del método), por lo que es recomendable tener blancos que nos permitan restar esta contribución.

El MEAC tiene un límite de detección bajo debido a que es capaz de detectar hasta $0.1 \mu\text{M}$ de CoA. Si se agregan a este ensayo entre 60 y 500 pmol de CoA, se observa una relación lineal entre la cantidad de CoA y la velocidad de producción de NADH (Fig. 21a). Cuando la concentración es mayor de 15 nmol, la curva puede ajustarse bien a una hipérbola rectangular. A concentraciones menores a $30 \mu\text{M}$, en el MEAC se produce un incremento lineal de la absorbancia a 340 nm en los primeros 15 min (Fig. 21b). De acuerdo con este resultado, la concentración de CoA, producto de la actividad de la DAG-AT, se determinó con el MEAC tomando el cambio de absorbancia registrado entre los cinco y los 15 min.

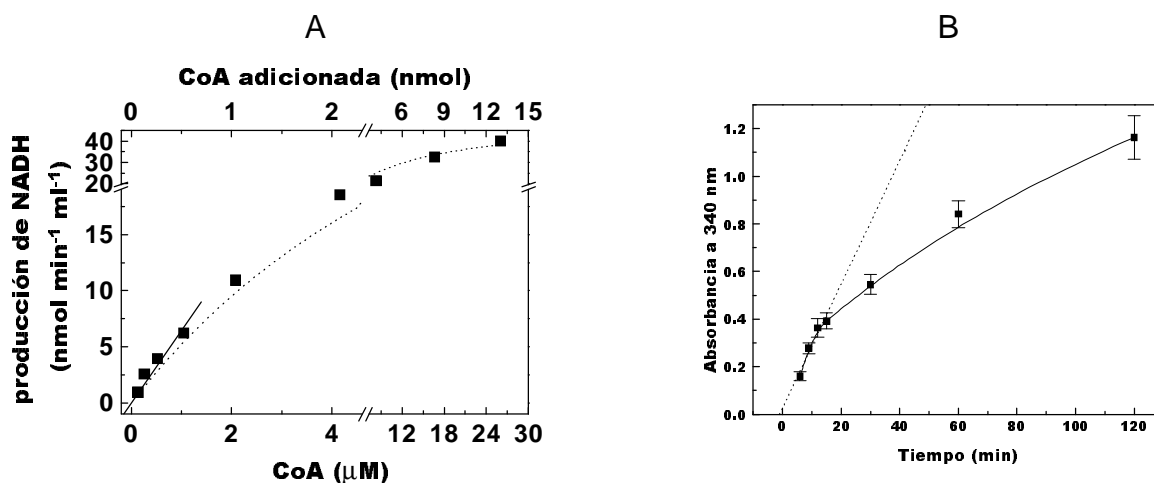


Figura 21. Velocidad de producción de NADH en el MEAC en función de la concentración de CoA adicionada al ensayo (A) y en función del tiempo después de la adición de CoA libre $1 \mu\text{M}$ (B).

Este método no se afecta por la presencia de nucleótidos ó sus derivados debido a la elevada selectividad de la PAT y la CS por la CoA (a diferencia de los ensayos colorimétricos basados en la titulación del grupo tiol de la CoA). Este método tampoco se afecta por la presencia de 2, β -mercaptoetanol, DTT o proteínas reducidas (Michal y Bergmeyer, 1989). En resumen, las ventajas del MEAC son: límite de detección bajo de cantidades de CoA libre, la rapidez con la que se conoce la actividad de la DAG-AT, puesto que no es necesario separar otros productos o

reactantes de la mezcla, lo que mejoró la reproducibilidad; el que no sean necesarios precursores radiactivos y la especificidad de las enzimas empleadas.

6.2 Determinación de la actividad DAG-AT en varios tejidos evaluada por dos métodos

Los productos de la reacción catalizada por la DAG-AT se recuperan en la misma parte del proceso en las fases orgánica y la acuosa. De este modo, si se incluye un precursor radiactivo, es posible la cuantificación paralela de CoA y el TAG en el mismo ensayo con ambos métodos, el MEAC y el método con radioisótopos (Figuras 18 y 20). Entonces, se determinó la actividad de la DAG-AT en fracciones microsomales de maíz, trigo, chícharo, hígado y adipocitos de rata con ambos métodos para validar el MEAC. Los resultados en la Tabla V muestran que la relación entre CoA liberado y [¹⁴C]-TAG producido en ambos ensayos es cercana a uno. Esto significa que si en la fracción microsomal existen tioesterasas, aciltransferasas o transacilasas estas actividades contribuyen muy poco a la generación de CoA y/o TAG. Luego, se muestra que la actividad de DAG-AT en las fracciones microsomales de trigo es la más alta. Lo resultados aquí presentados indican claramente que la actividad detectada es exclusivamente de la DAG-AT.

TABLA V. Comparación de la actividad DAG-AT en diferentes tejidos determinada por el método con radioisótopos y el MEAC. Los productos de la reacción de DAG-AT (de 5 min de incubación) se recuperaron después de centrifugar la mezcla de reacción.

Fracción microsoma	Método con radioisótopos nmol min ⁻¹ mg	MEAC ^b nmol min ⁻¹ mg	Tiempo de incubación minutos
maíz	0.11 ± 0.10	0.19 ± 0.08	0
maíz	52.20 ± 4.80	53.10 ± 8.30	5
trigo	0.17 ± 0.02	0.12 ± 0.07	0
trigo	81.21 ± 1.02	87.11 ± 1.40	5
chícharo	0.07 ± 0.01	0.17 ± 0.04	0
chícharo	20.35 ± 0.83	22.04 ± 2.27	5
hígado de rata	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.09	0
hígado de rata	33.65 ± 1.01	34.36 ± 0.01	5
adipocitos de rata	0.10 ± 0.01	0.14 ± 0.06	0
adipocitos de rata	58.99 ± 3.19	53.36 ± 1.88	5

El [¹⁴C]-TAG y la CoA productos de la actividad DAG-AT fueron detectados con centelleo líquido (a) y espectrofotométricamente (b). Los resultados son la media de tres diferentes experimentos hechos por triplicado.

Por otra parte, también se determinó la actividad de la DAG-AT en fracciones microsomales de maíz a varias concentraciones de oleoil-CoA. En la Figura 22 se observa que las velocidades iniciales revelan una cinética de tipo Michaelis-Menten con una K_M de $9.9 \pm 1.1 \mu\text{M}$ para oleoil-CoA, con dipalmitina $330 \mu\text{M}$ como aceptor de acilos. La V_{MAX} fue de $56.4 \pm 2.5 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, pero este valor varía sensiblemente de una preparación a otra. El valor de la K_M es, en cambio, muy cercano al reportado por Cao y Huang (1987) empleando di-oleoil-diacilglicerol como aceptor y es reproducible.

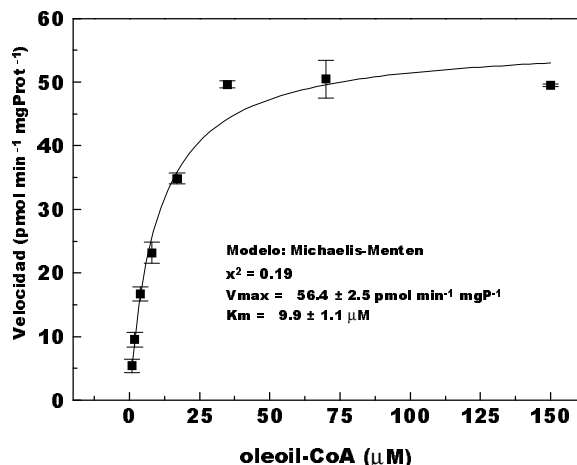


Figura 22. Curva de saturación de la actividad DAG-AT con oleoil-CoA medida con el MEAC. La actividad de DAG-AT se midió con diferentes cantidades de oleoil-CoA y con dipalmitina 330 μM .

6.3 Aplicación de dos procedimientos para purificar la DAG-AT de embriones inmaduros de maíz

En este trabajo se reprodujo el protocolo de purificación de la DAG-AT de acuerdo con lo reportado por Kwanyuen y Wilson (1986) para cotiledones en desarrollo de soya. Se obtuvo un extracto crudo de embriones inmaduros de maíz y se aplicó a una columna de DEAE Sephacel. El extracto crudo se eluyó de la columna como se describe en la sección 5.2.7. El perfil de elución de la proteína y la actividad DAG-AT se grafican en la Figura 23. La proteína aplicada (absorbancia a 280 nm) eluye en dos picos principales: uno en el volumen de lavado y otro al final del gradiente de KCl. La zona de disminución del primer pico de proteína coincide con un pico muy claro de la actividad de DAG-AT (entre las fracciones 23-28), mientras que el pico de proteína al final del gradiente de KCl no presenta actividad de DAG-AT. Las fracciones con actividad de DAG-AT obtenidas de esta columna se agruparon en una sola muestra para obtener la fracción membranal. La actividad específica de la fracción membranal fue de $51.3 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$, sin embargo, representa únicamente el 0.01% de la actividad en la fracción cruda. Posteriormente, el protocolo propone la solubilización de la enzima con el detergente CHAPS (9 mM); el solubilizado se pasaría por una columna de filtración; sin embargo, no se continuó con este protocolo debido a que la actividad de la DAG-AT fue indetectable con ambos métodos (datos no mostrados) cuando se agrega el detergente.

Igualmente, se reprodujo un segundo protocolo de purificación de la actividad DAG-AT reportado por Little *et al.* (1994). A la fracción microsomal de embriones inmaduros de maíz se le agregó el detergente MEGA-8 (1 % p/v) con 0.5 M de NaCl en una relación de 5:1 detergente:proteína (ver sección 5.2.7). El solubilizado se aplicó a una columna de filtración Superdex 200 HR120 en el sistema de FPLC. En la gráfica de la Figura 24 se muestra el perfil de absorbancia de proteínas y el de la radiactividad en dpm en los TAG. El pico del perfil de [^{14}C]-TAG y el de absorbancia a 280 nm coincide con un pico de máxima actividad de la DAG-AT (en la fracción número 30). La actividad es de $81.9 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$ equivalente a unas 2600 dpm de [^{14}C]-TAG. Sin embargo, esta preparación activa de DAG-AT representa el 1% de la actividad microsomal y también presenta otras actividades de aciltransferasas.

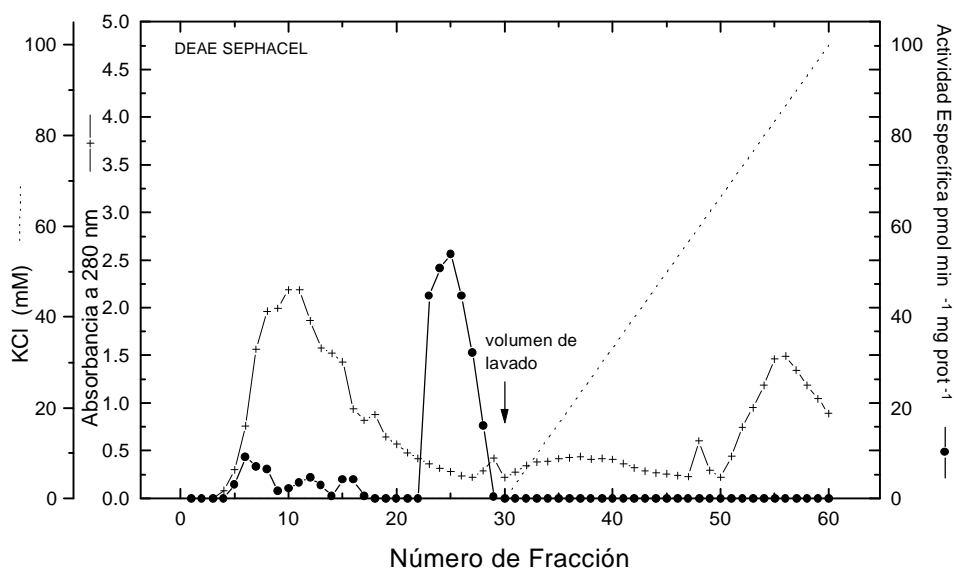


Figura 23. Perfil de actividad de DAG-AT en columna de DEAE Sephacel. La fracción cruda extraída de embriones en desarrollo de maíz se aplicó a la columna. El amortiguador de elución fue Tris-HCl, 25 mM, pH 7.4, β -mercaptoetanol 15 mM y EDTA 1 mM. También, la columna se eluyó con el mismo amortiguador de elución con un gradiente de KCl hasta 0.1 M. Las fracciones eluidas con actividad de DAG-AT fueron centrifugadas a 100,000 x g para obtener los microsomas.

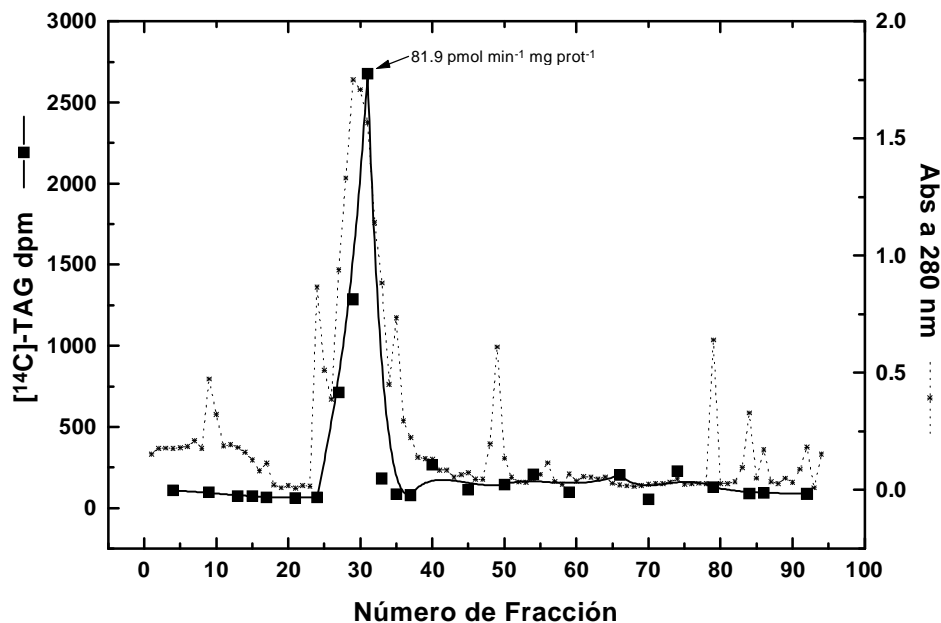


Figura 24. Perfil de actividad de DAG-AT en una columna de filtración Superdex 200 HR120. La fracción microsomal extraída de embriones en desarrollo de maíz se aplicó a la columna de filtración en el sistema de FPLC a un flujo de 0.5 mL/min. Se utilizó como eluyente un amortiguador de Tris-HCl 0.1 M, pH 7.4, MEGA-8 0.1% p/v, NaCl 0.5 M, glicerol 20% v/v, DTT 1 mM e inhibidores de proteasas.

6.4 Efecto de los detergentes en la actividad DAG-AT

El primer paso hacia la purificación de una proteína de membrana es su extracción de la bicapa a una forma solubilizada. Los detergentes -moléculas anfipáticas- pueden unirse a las proteínas en las zonas hidrofóbicas e interactúan en la fase acuosa con la otra parte de la molécula debido que forman micelas en el agua. Esta característica permite mantener a las proteínas en una forma solubilizada. Por esta razón, las proteínas integrales de membrana son típicamente extraídas con diferentes concentraciones de detergentes (de 0.5 hasta 2%) en una relación detergente:proteína de 1:1 a 3:1 (Banerjee, 1995). En el presente trabajo se utilizaron 13 diferentes detergentes con diferentes estructuras, características y clases iónicas (ver anexo 1) a una concentración de 1% y a una relación de 2:1 detergente:proteína para extraer la DAG-AT en forma activa. También se utilizó la combinación de los detergentes con diferentes concentraciones de NaCl. Usualmente, si se aumenta la fuerza iónica se aumenta la solubilización de la proteína (Revzin, 1994), se reduce la concentración micelar crítica de los detergentes y mejora la estabilidad de las micelas.

La fracción microsomal obtenida de embriones inmaduros de maíz se utilizó para las solubilizaciones de la actividad DAG-AT (ver sección 5.2.7). Las fracciones solubles obtenidas de los 13 diferentes detergentes con o sin 150 mM de NaCl se ensayaron para la actividad DAG-AT. En la Figura 25a se presenta el porcentaje recuperado de la actividad de la DAG-AT soluble. En esta gráfica se muestra que solamente con los detergentes PPEG-25, el Brij 35 y el MEGA-8 se mantuvo la actividad de la DAG-AT en la fracción soluble. Aquí hay que mencionar que el detergente PPEG-25 mostró un comportamiento inusual debido a que una preparación al 1% a temperatura ambiente se mantiene soluble, pero se sedimenta a 4°C y esto hace difícil su manejo durante las pruebas de solubilización. No se obtuvo a la DAG-AT en forma activa en fracciones solubles de los detergentes no iónicos (Nonidet, Tritón X-100, Tritón X-114), aniónicos (deoxicolato de sodio, dodecilsulfato de sodio) y catiónico (CTAB) por lo que no se utilizaron para experimentos posteriores (datos no mostrados). Finalmente, todas las fracciones solubles se dializaron pero no se incrementó ni tampoco se recuperó la actividad de la enzima (datos no mostrados).

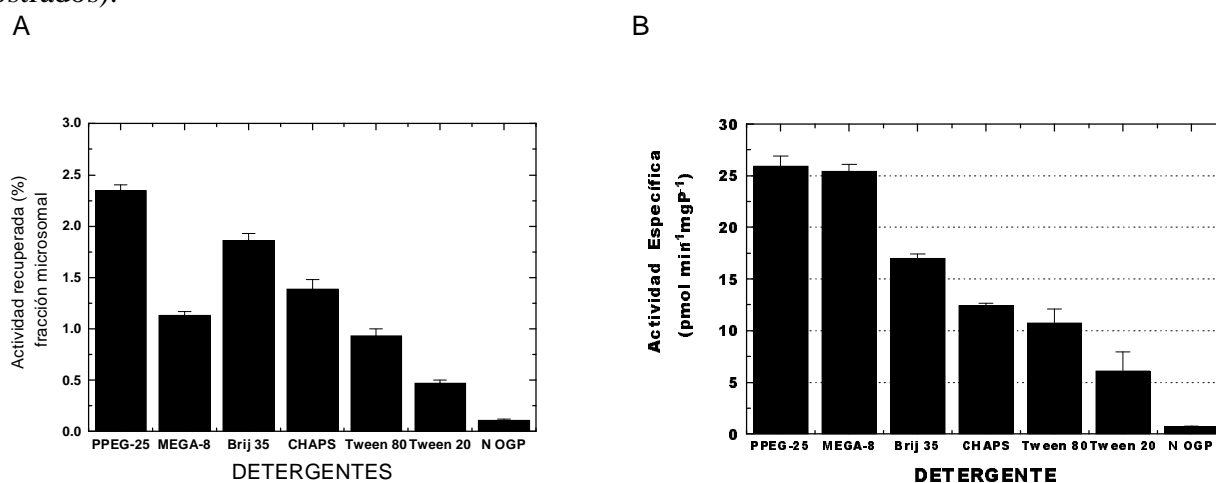


Figura 25. Actividad de DAG-AT en presencia de diferentes detergentes. La fracción microsomal de embriones inmaduros de maíz se trató con el detergente indicado con NaCl 150 mM y se centrifugó a 100,000 x g durante 1h. Porcentaje de actividad soluble recuperada de la fracción microsomal (A) y actividad específica de DAG-AT (B). Se grafica la media y la desviación estándar de tres experimentos hechos por duplicado.

En el presente trabajo, el detergente MEGA-8 (utilizado por Little y colaboradores en 1994 para solubilizar a la DAG-AT de colza) también conservó activa a la enzima de embriones inmaduros de maíz. En la Figura 25b se grafica la actividad específica de la DAG-AT de la fracción soluble de cada uno de los detergentes empleados. La fracción soluble obtenida del tratamiento con PPEG-25 y MEGA-8 fueron muy similares ($25 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$) sin embargo, no se siguió utilizando el detergente PPEG-25 por las razones expuestas anteriormente.

La actividad de la DAG-AT de las fracciones solubles disminuyó considerable con respecto a la actividad original (Fig. 25a). Por ejemplo, con el MEGA-8 se obtuvo escasamente el 1% de actividad recuperada con respecto a la de la fracción microsomal, entre tanto, con otros detergentes el porcentaje de la actividad recuperada fue alrededor del 1.5% con respecto a la actividad original. Además, cuando se midió la actividad de la DAG-AT de las fracciones solubles mantenidas a 4°C durante 24 h ésta actividad disminuyó considerablemente (Fig. 26). Únicamente la actividad de DAG-AT fue estable con el detergente MEGA-8.

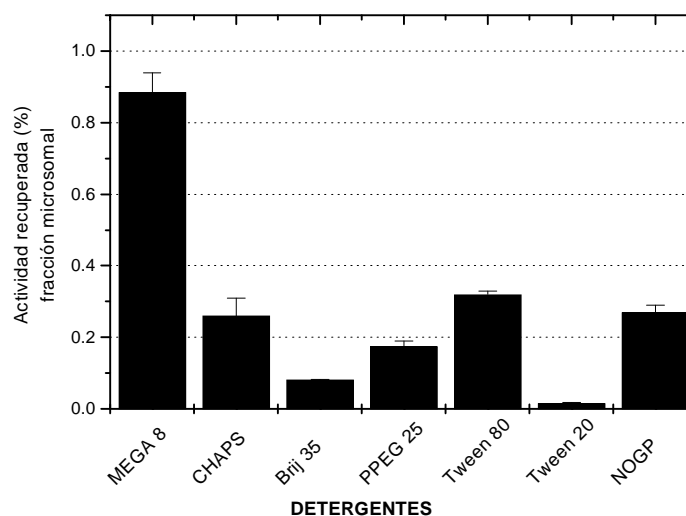


Figura 26. Estabilidad de DAG-AT en presencia de diferentes detergentes. La actividad de DAG-AT de la fracción soluble de los tratamientos con diferentes detergentes se midió después de 24 horas a 4°C . Se grafica la media y la desviación estándar de tres experimentos hechos por duplicado.

Por último, se ensayó la actividad de la DAG-AT en la fracción soluble obtenida de las solubilizaciones a diferentes concentraciones del detergente MEGA-8 (Fig. 27a) y aumentando la fuerza iónica con diferentes concentraciones de NaCl (Fig. 27b). La actividad de la DAG-AT se mantiene prácticamente igual al aumentar la cantidad de detergente. Por su parte, la actividad en la fracción soluble no aumenta cuando la fracción microsomal es tratada con diferentes concentraciones de NaCl en presencia de MEGA-8 1%. Parte de esta actividad permanece en la fracción no soluble, pero además, la actividad total es bastante inferior a la actividad total en los microsomas crudos de los que se partió, lo que refleja un efecto negativo del detergente sobre la actividad.

A

B

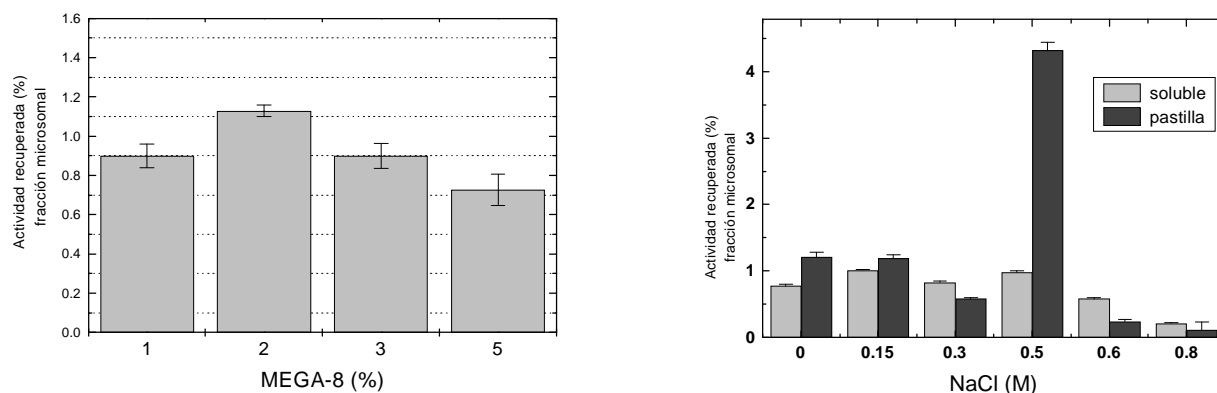


Figura 27. Actividad recuperada de DAG-AT tratada con MEGA-8. La fracción microsomal de embriones inmaduros de maíz se trataron con diferentes concentraciones de MEGA-8 (A) o con MEGA-8 al 1% y diferentes concentraciones de NaCl (B). Se grafica la actividad recuperada como porcentaje de la actividad inicial de la fracción soluble (barras grises) y en la fracción de la pastilla (barras negras). Se grafica la media y la desviación estándar de dos experimentos hechos por duplicado.

6.5 Las preparaciones de DAG-AT contienen DAG endógeno

La actividad de la DAG-AT se ha reportado en la fracción microsomal utilizando [^{14}C]-acilCoA y DAG emulsionado con tween-20 (DAG/tween) como donador y aceptor de acilos, respectivamente (Cao y Huang, 1986). En este trabajo, también se encontró que las fracciones microsomales de maíz, de trigo, de chícharo, de hígado y de tejido adiposo de rata presentan actividad de DAG-AT con [^{14}C]-oleoilCoA y DAG/tween (Tabla VI). Sin embargo, la actividad de DAG-AT fue similar aunque no se agregue DAG/tween en el medio de reacción solo para el caso del maíz (Tabla VI, fm). Estos resultados revelan que la DAG-AT presente en las fracciones microsomales no requiere de aceptor de acilos exógeno para la formación de TAG en las condiciones de ensayo empleadas aquí, seguramente porque dichas fracciones contienen abundante cantidad de éste. También, la actividad de la DAG-AT fue muy parecida en presencia o ausencia de DAG/tween con las fracciones solubles (Tabla VI, fs).

De igual forma, se les midió la actividad de DAG-AT a las fracciones microsomales de embriones en desarrollo de maíz obtenidas con el protocolo de purificación reportado por Little y colaboradores, 1994 (sección 5.2.7). La actividad medida sin aceptor de acilos resultó muy baja, sin embargo, se recuperó al añadir DAG/tween en el medio de reacción y es muy semejante a la reportada por estos autores (Tabla VI, fp). En este punto hay dos implicaciones: primero, es posible que el MEGA-8 reduzca el contenido de DAG endógeno de las fracciones microsomales y segundo, es posible que el DAG exógeno adicionado (como DAG/tween) no sea igualmente accesible a la enzima que el DAG endógeno. Lo anterior explicaría que en los tratamientos de la proteína microsomal con detergentes se recupere solamente el 1% de la actividad de DAG-AT. También explicaría la semejanza de los valores de actividad de DAG-AT cuando se mide con diferentes concentraciones de DAG exógeno en el medio de reacción (datos no mostrados). Por consiguiente, se obviaron los estudios de saturación con DAG de la enzima en las fracciones microsomales crudas. Pero, esta limitante pudo resolverse añadiendo el DAG con una estrategia diferente (ver más adelante).

Tabla VI. Actividad de DAG-AT determinada por el MEAC en fracciones microsomales, solubles y purificadas de varios tejidos. A las fracciones microsomales se les agregó MEGA-8 (1%) y NaCl (150 mM). Posteriormente se centrifugaron a 100,000 x g y se obtuvieron las fracciones solubles y purificadas. Para la medición de la actividad DAG-AT el DAG (0.3 M) se emulsionó con tween-20 (0.02%) y agregó al medio de reacción.

Tejido	Actividad de DAG-AT (nmol CoA min ⁻¹ (mg proteína) ⁻¹)	
	con DAG	sin DAG
maíz fm	53.10 ± 8.30	57.30 ± 5.11
maíz fp	65.61 ± 0.11	2.59 ± 0.93
trigo fm	87.11 ± 1.40	5.47 ± 0.01
trigo fs	85.40 ± 0.67	2.12 ± 0.51
chícharo fm	22.04 ± 2.27	10.08 ± 0.06
chícharo fs	24.13 ± 0.04	1.01 ± 0.16
hígado fm	34.36 ± 0.01	10.50 ± 0.01
hígado fs	1.73 ± 0.77	0.01 ± 0.89
adipocitos fm	53.36 ± 1.88	22.14 ± 0.09
adipocitos fs	56.42 ± 0.38	1.80 ± 0.88

fm= fracción microsomal, **fs**= fracción soluble, **fp**= fracción purificada.

Se presenta el resultado de un experimento representativo hecho por duplicado.

El experimento se repitió tres veces.

Se ha reportado que el DAG es el intermediario más abundante de la vía de Kennedy (Weselake, 2000; Perry y Harwood, 1993a) sin embargo, no era claro cuanto de éste se extrae en nuestras preparaciones (fracciones cruda, microsomal y soluble). Para investigarlo, se extrajo y analizó la composición de lípidos presentes en embriones de maíz enteros (fracción cruda), en las fracciones membranales recuperadas por centrifugación a 100 000 x g (fracción microsomal) y en las fracciones tratadas con MEGA-8 (fracción soluble). Los lípidos se extrajeron con una mezcla de cloroformo:metanol (1:1, v/v) y se analizaron mediante TLC. Los resultados mostrados en la Figura 28 demuestran claramente que hay una cantidad substancial de DAG y TAG en la fracción microsomal y en la fracción soluble con MEGA-8. También se observan altos niveles de fosfolípidos y niveles muy bajos de MAG. Incluso, la relación del DAG con respecto al TAG fue más elevada en la fracción microsomal que en los lípidos totales extraídos del embrión entero.

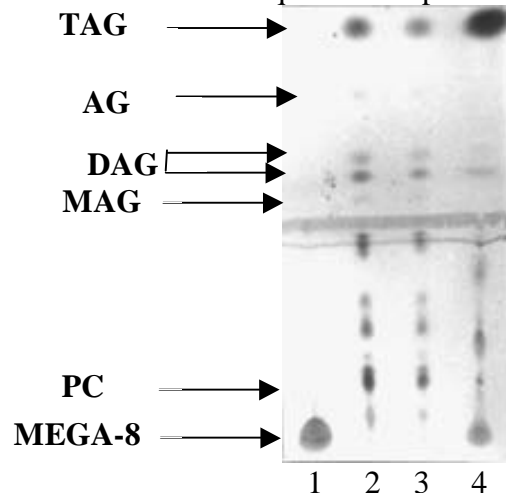


Figura 28. TLC de lípidos extraídos de embriones inmaduros de maíz. Detergente MEGA-8 (1), fracción cruda (2), fracción microsomal (3), fracción solubilizada con MEGA-8 (4). TAG= triacilglicerol, AG= ácidos grasos, DAG= diacilglicerol, MAG= monoacilglicerol y

PC= fosfatidilcolina.

6.6 Eliminación del DAG endógeno de las preparaciones microsomales

Los resultados anteriores demuestran que las fracciones microsomales y las solubles de la DAG-AT de embriones inmaduros de maíz acarrean DAG. A fin de eliminar el DAG presente en la fracción microsomal se hicieron polvos de acetona (ver sección 5.2.3). En la Tabla VII se observa que los valores de la actividad de los polvos de acetona fueron muy semejantes en ausencia o en presencia de emulsiones de DAG/tween en el medio de reacción. Además, estas preparaciones tienen menor incorporación de marca en los TAG que la fracción microsomal. Esto sugiere fuertemente que la actividad se perdió en la medida en la que el DAG endógeno fue eliminado. Sin embargo, el análisis de TLC de estas preparaciones revelan que el DAG no fue eliminado por completo (no mostrado).

Tabla VII. Actividad de la DAG-AT en fracciones microsomales y de los polvos de acetona de embriones inmaduros de maíz. La actividad se midió con el método con radioisótopos y el MEAC en presencia o ausencia de DAG/tween.

ENSAYO	nmol min ⁻¹ mg prot ⁻¹	
	con DAG*	sin DAG*
fracción de microsomas	52.44 ± 1.9	50.80 ± 3.9
polvos de acetona de microsomas	24.86 ± 3.5	22.29 ± 2.8

*Los resultados son la media del experimento realizado por triplicado

En este trabajo se emplearon diferentes disolventes orgánicos para eliminar el DAG endógeno de las fracciones microsomales, como se describe en la sección 5.2.8. Los lípidos extraídos de cada una de las veces en las que se agregó el disolvente (lavados hasta cuatro veces) fueron recuperados y analizados en TLC. La Figura 29 muestra que todos los disolventes empleados extraen gran cantidad de lípidos polares y neutros de las fracciones microsomales. Los tratamientos con benceno y acetona extrajeron mayor cantidad de lípidos neutros.

También se midió la actividad de DAG-AT con [¹⁴C]-oleoilCoA y DAG/tween después de cada uno de los lavados. La actividad de la DAG-AT en los tratamientos con benceno, acetona y éter dietílico es más baja a medida que se aumentan los lavados (Fig. 30) mientras que la actividad fue indetectable desde el primer lavado en los tratamientos con diisobutilcetona, tetracloruro de carbono y hexano. Estos resultados sugieren que la enzima DAG-AT es incapaz de actuar sobre las micelas de DAG/tween presentes en el medio de reacción o bien, la presencia del DAG endógeno es importante para conservar la actividad enzimática. Fuera de la evidente relación de la enzima con el DAG, en estos experimentos no encontramos ninguna correlación adicional entre la clase de lípidos extraídos por los disolventes empleados y el nivel de actividad detectada.

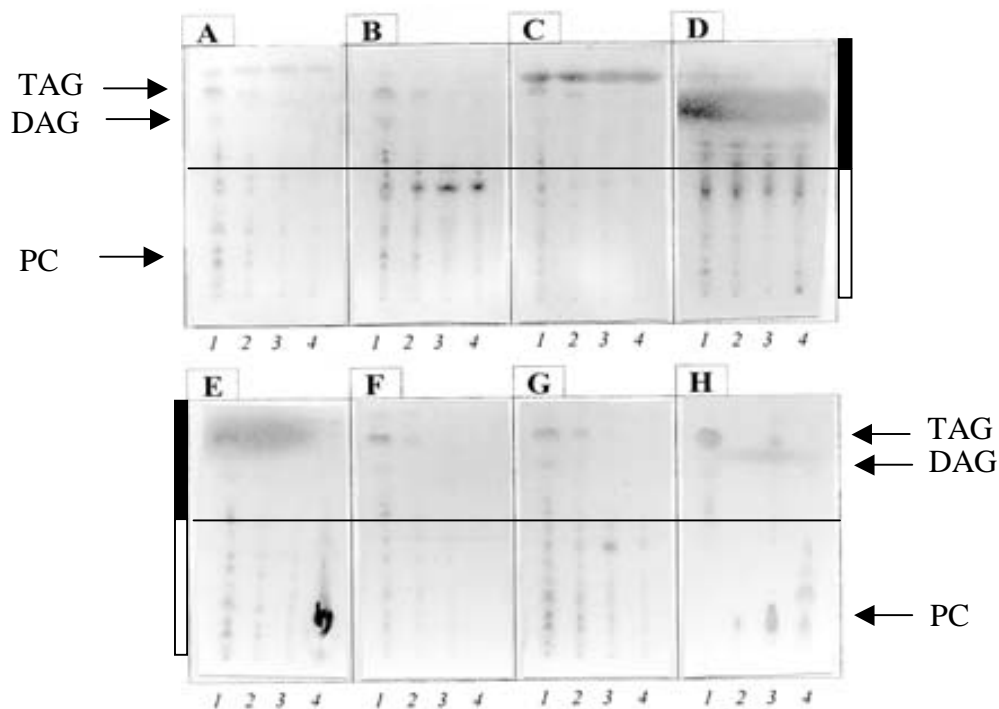


Figura 29. Extracción de lípidos de fracciones microsomales liofilizadas de embriones inmaduros de maíz. Se extrajeron los lípidos con el disolvente orgánico indicado. Los disolventes empleados fueron benceno (A), acetona (B), dietileter (C), diisobutilcetona (D), tetracloruro de carbono (E), hexano (F) y benceno:acetona 1:1, v/v (G). Los números indican los lavados sucesivos. En el panel H: aceite de oliva (carril 1), fosfatidilcolina (carril 2), lecitina (carril 3) y fracción lipídica de albúmina de huevo (carril 4). TAG=triacilglicerol, DAG=diacilglicerol, PC= fosfatidilcolina, =lípidos neutros =lípidos polares.

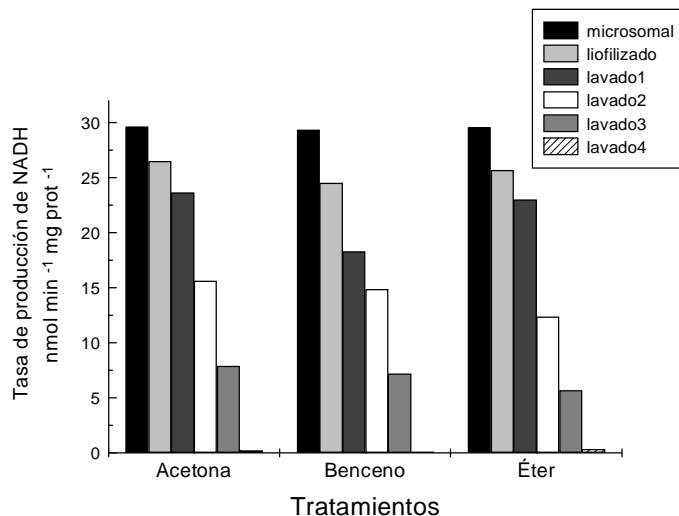


Figura 30. Actividad remanente de DAG-AT de la fracción microsomal de embriones inmaduros de maíz. A la fracción microsomal liofilizada se le agregó el disolvente indicado, se sonicó y centrifugó. Posteriormente se midió la actividad DAG-AT con el MEAC. Los lavados se hicieron con hasta por cuatro veces. La cantidad de proteína se mantuvo constante después de los lavados.

6.7 Actividad de la DAG-AT. Utilización del DAG endógeno y/o exógeno

Otra estrategia fue añadir el DAG con marca radiactiva al medio de reacción de DAG-AT para probar su utilización. Debido a que el [^{14}C]-DAG no está disponible comercialmente, se preparó [^{14}C]-1,2 -*rac*-diacilglicerol *in vitro* a partir de TAG etiquetado *in vivo* (ver sección 5.2.10). La actividad de la DAG-AT se midió en presencia o ausencia de micelas de DAG/tween con o sin marca radiactiva. En la Figura 31 se observa que la actividad de la DAG-AT fue similar y casi indetectable aún cuando no se añade al medio de reacción DAG y [^{14}C]-DAG/tween, respectivamente. Esto confirma los resultados anteriores y demuestra que el DAG/tween en el medio de reacción es inaccesible a la enzima. También se observa que cuando se agrega el [^{14}C]-oleoilCoA al medio de reacción, la actividad de la DAG-AT fue semejante con o sin [^{14}C]-DAG. Todo se explica si la enzima utiliza solamente el DAG endógeno (en concordancia con la Tabla VII), así en la actividad final no hay aporte del DAG marcado del medio de reacción y la aparición de marca en el producto proviene exclusivamente de los acilos del oleoil-CoA marcado. También se les midió actividad de DAG-AT a las fracciones microsomales y a las solubles tratadas con MEGA-8. La actividad microsomal medida con DAG/tween y [^{14}C]-oleoil-CoA resultó muy similar a la obtenida con [^{14}C]-DAG y oleoil-CoA, sin embargo, la actividad de las fracciones solubles fue 50% menor cuando se ensayo con [^{14}C]-DAG y oleoil-CoA (Fig. 32).

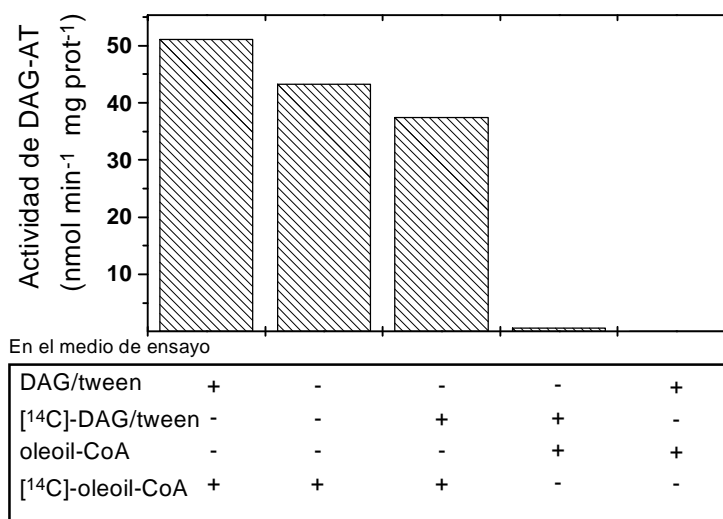


Figura 31. Actividad de la DAG-AT en fracciones microsomales medida con DAG/tween y oleoil-CoA en el medio de reacción. La medición de la actividad de DAG-AT de las fracciones microsomales se realizó en amortiguador tris-HCl 0.1 M, pH 7.4, sacarosa 0.084 M, MgCl_2 2mM, ácido palmítico 0.1mM y 200 μg de proteína microsomal en un volumen final de 150 μL . En algunos ensayos el medio de reacción contenía además DAG 0.3 mM emulsionado con 0.02% de tween-20 y oleoil-CoA 20 mM.

Con estos antecedentes se decidió estudiar a la enzima con otro método que nos permitiera por una parte, proporcionarle de manera eficiente el sustrato a la enzima y por otro, eliminar el sustrato endógeno sin que se inactive a la enzima.

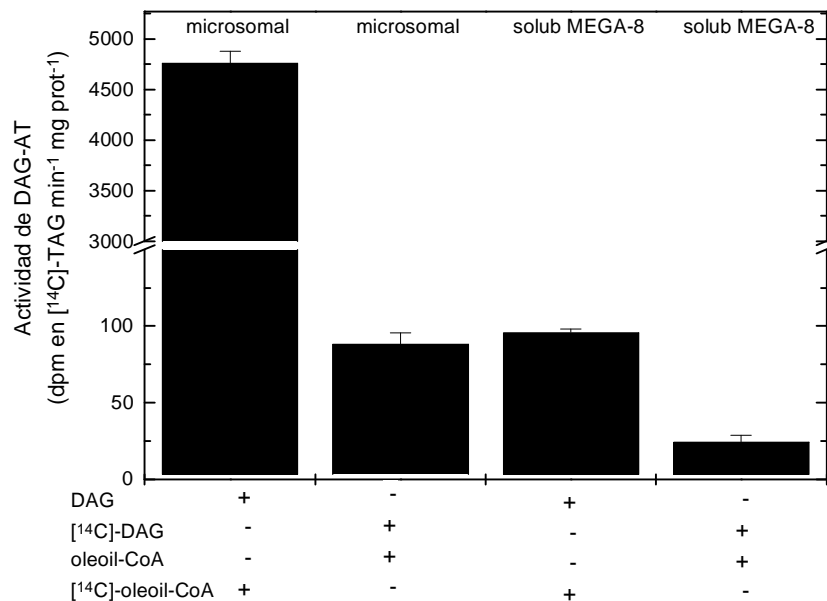


Figura 32. Actividad de la DAG-AT en fracciones microsomales y solubilizadas medida con DAG y oleoil-CoA con y sin marca radiactiva. La medición de la actividad de DAG-AT de las fracciones microsomales y solubilizadas se realizó en amortiguador Tris-HCl 0.1 M, pH 7.4, sacarosa 0.084 M, MgCl₂ 2mM, ácido palmítico 0.1mM, tween-20 0.02% y 200 µg de proteína microsomal en un volumen final de 150 µL. Los ensayos contenían además DAG 0.3 mM y oleoil-CoA 20 mM con o sin marca. Se grafica la media y la desviación estándar de dos experimentos hechos por duplicado.

Hasta el momento hemos demostrado que la DAG-AT consume ineficazmente el DAG/tween agregado en el medio de reacción, puesto que la actividad es muy similar si no se agrega este sustrato (Tabla VI, Tabla VII y Fig. 31). También indicamos que las fracciones microsomales y las solubles contienen DAG endógeno y los procedimientos de solubilización con detergentes no lo eliminan completamente (Fig. 28). Además, los procedimientos de lavado de la fracción microsomal con disolventes orgánicos extraen el DAG endógeno (Fig. 29) con la consecuente pérdida de actividad de la DAG-AT aún con la adición de DAG/tween (Fig 30).

En este punto, se aprovechó la tolerancia de la DAG-AT a los disolventes en las preparaciones microsomales liofilizadas para añadir [¹⁴C]-DAG disuelto en benceno (procedimiento reportado por Slack *et al.*, 1973 y 1985; Vogel y Browse, 1996 y Lozaman, 1995). Siguiendo éstas y nuestras observaciones, las fracciones microsomales de embriones de maíz se liofilizaron y lavaron hasta cuatro veces con diferentes disolventes. Luego, se les agregó PC pura y DAG disueltos en el benceno (como lo hicieron Vogel y Olhrogge, *op. cit.*). Posteriormente, se evaporó el disolvente y se sonicó la muestra con el amortiguador de reacción (ver sección 5.2.11). Finalmente, se estimó la actividad de la DAG-AT por la aparición de TAG marcados. Cabe mencionar que la lecitina de soya comercial contiene DAG por lo que se tuvo que eliminar el DAG para obtener PC pura (ver sección 5.2.9). En la Figura 33 se muestra que se restableció la actividad cuando se agregó PC y DAG en el benceno incluso con aquellos tratamientos en donde la DAG-AT no presentaba actividad desde el primer lavado con hexano, tetracloruro de carbono y diisobutilcetona. Esto nos indica que el DAG es accesible a la DAG-AT si se disuelve en el benceno y que la enzima es resistente a los tratamientos, en mayor o menor grado.

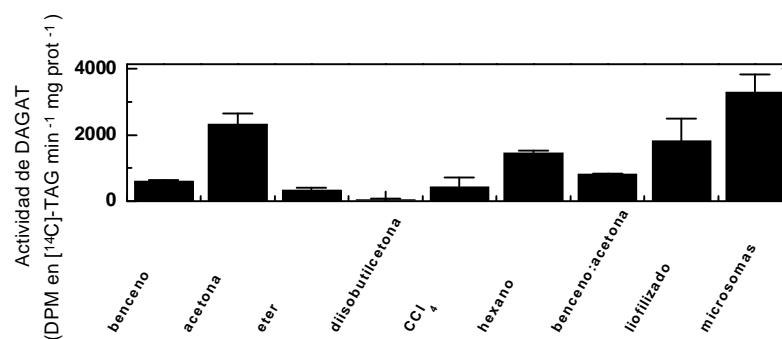


Figura 33. Actividad de la DAG-AT deslipidada y reconstituida. Las fracciones microsomales se lavaron cuatro veces con el disolvente indicado. Posteriormente, las fracciones se reconstituyeron con DAG 0.3 mM y fosfatidilcolina 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La actividad recuperada se ensayó en amortiguador de Tris-HCl 0.1 M, pH 7.4, ácido palmítico 0.1 mM, MgCl_2 2 mM, sacarosa 0.084 M y $[^{14}\text{C}]\text{-oleoyl-CoA}$ (0.2 μCi). El medio de reacción no contenía DAG. Se grafica la media de dos experimentos que se hicieron por triplicado.

En la Tabla VIII se muestra que la actividad de la DAG-AT se afecta muy poco si la fracción microsomal se liofiliza. De acuerdo con este resultado y los anteriores, se pueden extraer los DAG endógenos que acarrean las fracciones microsomales y se puede medir la actividad de la DAG-AT agregando el DAG en el benceno. Por lo tanto, se midió la actividad de la DAG-AT agregando el $[^{14}\text{C}]\text{-DAG}$ en el benceno. La actividad fue un tercio más baja que la fracción microsomal sin tratamiento. Esto puede explicarse a que la radiactividad en el producto de la enzima proviene del DAG agregado en el benceno, sin embargo, también hay presencia de DAG endógeno que acarrean las fracciones microsomales, de tal forma que si la enzima acila este DAG (con oleoilCoA en el medio de reacción) en el experimento no hay aparición de TAG como marca radiactiva. En el caso de agregar el DAG en el benceno y medir la actividad con $[^{14}\text{C}]\text{-oleoil-CoA}$ en el medio de reacción sería la misma explicación anterior además de que se toma en cuenta el aporte de ambos sustratos (DAG endo y exógeno) para el cálculo de la actividad final de DAG-AT. Finalmente, se observa que la adición del detergente MEGA-8 y el DAG disuelto en el benceno, no inhibe a la enzima, sino que se recuperó mayor porcentaje de actividad de la DAG-AT que en el tratamiento con $[^{14}\text{C}]\text{-DAG}$ en el benceno.

También la actividad de DAG-AT se midió agregando (en el benceno o en el medio de reacción) diversas combinaciones de oleoil-CoA, DAG, tween-20, PC, $[^{14}\text{C}]\text{-oleoilCoA}$ y $[^{14}\text{C}]\text{-DAG}$. La Tabla IX muestra los resultados de la actividad DAG-AT reconstituída con tween-20 después de los lavados con benceno. La actividad se midió agregando el DAG (con o sin marca) disuelto en el benceno o en el medio de reacción. El oleoil-CoA se agregó solamente en el medio de reacción con o sin marca radiactiva. Los resultados muestran que la proteína reconstituida con tween-20 presenta una actividad muy baja (1.3 y 1.0 %) después de los lavados con benceno aún cuando se agrega oleoil-CoA y DAG al medio de reacción. Esto se debe a que la enzima no es capaz de utilizar el DAG del medio de reacción y a la ausencia de DAG endógeno (extraído con el disolvente). Sin embargo, al reconstituir a la proteína con tween-20 y DAG, se incorpora marca en los TAG proveniente del $[^{14}\text{C}]\text{-oleoil-CoA}$ en el medio de reacción. Esto sugiere fuertemente que la enzima utiliza preferentemente los DAG endógenos y tiene limitado el acceso de DAG cuando es presentada en forma micelar con tween-20 en el ensayo enzimático. Los resultados fueron semejantes con mayor concentración de tween-20 para la reconstitución de la enzima (datos no mostrados).

TABLA VIII. Medición de la actividad de DAG-AT con sus sustratos añadidos al medio de reacción o en el benceno. A las fracciones microsomales obtenidas de embriones inmaduros de maíz se les midió actividad de DAG-AT agregando el DAG disuelto en benceno y el oleoyl-CoA al medio de reacción enzimática. El medio de reacción contenía amortiguador Tris-HCl 0.1 M, pH 7.4, sacarosa 0.084 M, tween-20 0.02%, MgCl₂ 2 mM, ácido palmítico 0.1 mM y 200 µg de proteína microsomal en un volumen final de 150 µL. El DAG y el oleoylCoA añadido fue el requerido para alcanzar una concentración final de 0.3 mM y 20 mM, respectivamente. El MEGA-8 añadido fue 1% final.

<i>Preparación</i>	<i>Sustrato en el benceno</i>	<i>Sustrato añadida al medio de reacc</i>	<i>Actividad de DAG-AT (%)</i>
microsomias	sin tratamiento	DAG + oleoil-CoA	0.7
microsomias	sin tratamiento	DAG + [¹⁴ C]-oleoil	100
microsomias liofilizados	sin tratamiento	DAG + [¹⁴ C]-oleoil	91
microsomias liofilizados	DAG	[¹⁴ C]-oleoilCoA	53
microsomias liofilizados	[¹⁴ C]-DAG	oleoil-CoA	65
microsomias liofilizados	[¹⁴ C]-DAG +MEG	oleoil-CoA	81

Los resultados son la media de tres experimentos realizados por duplicado. La actividad del control fue de 235 nmol min⁻¹ mg prot⁻¹.

La actividad de la DAG-AT se restablece reconstituyendo a la enzima con DAG y tween (Tabla IX) sin embargo, la enzima es inactiva cuando se reconstituye con DAG (Tabla X). Tampoco se observó actividad de DAG-AT adicionando solamente PC en el benceno aún con la presencia de DAG en el medio de reacción. La actividad de la DAG-AT fue recuperada agregando DAG y PC disuelta en el benceno (Tabla X). De estos tratamientos, se recuperó más actividad cuando se reconstituye a la proteína con PC que con tween-20 o con MEGA-8. Esto confirma nuevamente que la DAG-AT utiliza los DAG endógenos o los exógenos aplicados en fase orgánica y que es necesaria la presencia de tween-20, MEGA-8 o PC para restablecer la actividad a niveles semejantes a los observados en las fracciones microsomales crudas. Es importante señalar que la actividad de la DAG-AT fue similar en estos experimentos cuando se añade DAG marcado y oleoyl-CoA.

Tabla IX. Actividad de DAG-AT reconstituida con tween y medida con sus sustratos añadidos al medio de reacción o en el benceno. Las fracciones microsomales liofilizadas obtenidas de embriones inmaduros de maíz se lavaron hasta cuatro veces con benceno. La actividad de DAG-AT se midió agregando tween y DAG con o sin marca disuelto en benceno y el oleoyl-CoA al medio de reacción enzimática. El medio de reacción contenía amortiguador Tris-HCl 0.1 M, pH 7.4, sacarosa 0.084 M, tween-20 0.02%, MgCl₂ 2 mM, ácido palmítico 0.1 mM y 200 µg de proteína microsomal en un volumen final de 150 µL. El DAG y el oleoylCoA añadido fue el requerido para alcanzar una concentración final de 0.7 mM y 20 mM, respectivamente.

En la solución de benceno			En el medio de reacción			actividad DAG-AT nmol min ⁻¹ mg de prot ⁻¹
tween-20	DAG	[¹⁴ C]-DAG	DAG	oleoilCoA	[¹⁴ C]-oleoilCoA	
+	-	-	+	+	+	1.3
+	-	-	-	+	+	1.0
+	+	-	-	+	+	133.0
+	-	+	-	+	-	118.0

Los resultados son la media de tres experimentos realizados por duplicado.

Con las evidencias anteriores se conoció la respuesta de DAG-AT a la saturación con DAG. Se reconstituyeron fracciones microsomales (liofilizadas y lavadas) con 15µg/mL de PC y cantidades crecientes de DAG (considerando la concentración de DAG por unidad de volumen)

ya que se encuentra en la fase sólida suspendida. La Figura 34 muestra que la DAG-AT presenta una cinética tipo Michaelis-Menten frente a la variación de dipalmitoilglicerol.

Tabla X. Actividad de DAG-AT reconstituida con fosfatidilcolina y medida con sus sustratos añadidos al medio de reacción o en el benceno. Las fracciones microsomales liofilizadas obtenidas de embriones inmaduros de maíz se lavaron hasta cuatro veces con benceno. La actividad de DAG-AT se midió agregando fosfatidilcolina y DAG con o sin marca disuelto en benceno y el oleoyl-CoA al medio de reacción enzimática. El medio de reacción contenía amortiguador Tris-HCl 0.1 M, pH 7.4, sacarosa 0.084 M, tween-20 0.02%, MgCl₂ 2 mM, ácido palmítico 0.1 mM y 200 µg de proteína microsomal en un volumen final de 150 µL. La fosfatidilcolina, el DAG y el oleoylCoA añadido fue el requerido para alcanzar una concentración final de 15 µg/mL, 0.7 mM y 20 mM, respectivamente.

						actividad DAG-AT nmol min ⁻¹ mg prot ⁻¹
En la solución de benceno			En el medio de reacción			
PC	DAG	[¹⁴ C]-DAG	DAG	oleoilCoA	[¹⁴ C]-oleoilCoA	
-	+	-	+	+	+	5
-	+	-	-	+	+	2
+	-	-	+	+	+	12
+	-	-	-	+	+	4
+	+	-	+	+	+	191
+	+	-	-	+	+	149
+	-	+	-	-	-	>0.5
+	-	+	+	+	-	172
+	-	+	-	+	-	159
+	-	+	-	+	+	200

Los resultados son la media de tres experimentos realizados por duplicado.

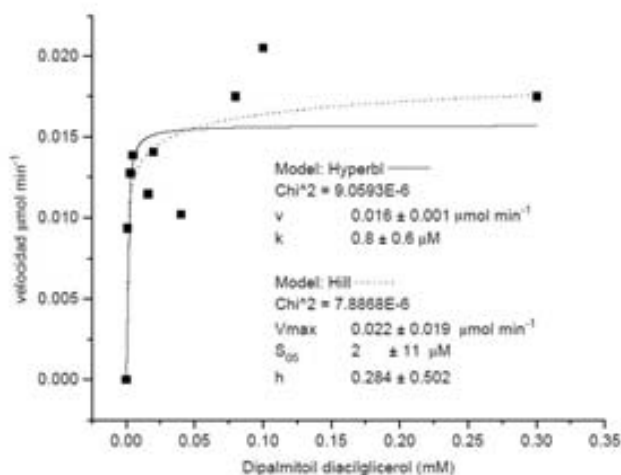


Figura 34. Curva de saturación de la actividad de DAG-AT con dipalmitina. Las fracciones microsomales se liofilizaron y se lavaron hasta cuatro veces con benceno. Se les reconstituyó con 15 µg/mL de fosfatidilcolina y dipalmitoil como se indica. El medio de reacción contenía el amortiguador Tris-HCl 0.1 M, pH 7.4, sacarosa 0.084 M, Tween-20 0.02%, MgCl₂ 2 mM, ácido palmítico 0.1 mM, [¹⁴C]-oleoil-CoA 20 mM (7 µCi/mmol) y 200 µg de proteína microsomal en un volumen final de 150 µL.

6.8 Detección de la actividad DAG-AT en cuerpos lipídicos de embriones maduros de maíz

La actividad de DAG-AT se encuentra en las fracciones de ER de los tejidos embrionarios de diversas semillas y en los LB de aceite de palma, de ricino y del hongo *Mortierella ramanniana* (Oo y Chew 1992; Settlege *et al.*, 1995 y Pillai *et al.*, 1998). Por ello, se purificaron los LB de embriones maduros de maíz con el procedimiento de Tzen *et al.*, (1992 y 1993; sección 5.2.4). Los resultados indican que LB de maíz carecen de actividad de DAG-AT si se miden con el método con radioisótopos tradicional. Sin embargo, presentaron actividad de DAG-AT cuando se lavaron y se reconstituyeron como se mencionó para las fracciones microsomales. Los lípidos extraídos de los LB de los lavados con benceno (hasta por cuatro veces) fueron TAG, MAG en gran cantidad, DAG y lípidos polares en poca cantidad (datos no mostrados). La actividad de los LB lavados y reconstituidos fue de $11.9 \pm 0.1 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$. Esta actividad representa el 29% de la actividad presente en la fracción microsomal recuperada del mismo lote de embriones ($41.8 \pm 0.5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$).

Por otra parte, también se ensayó la solubilidad de la proteína de los LB lavados con benceno. La proteína fue insoluble en metanol puro, dimetilsulfoxido, cloroformo o dietiléter. También, fue insoluble en mezclas de metanol:agua (1:1, v/v) con 1% de ácido trifluoroacético, sin embargo, fue una suspensión clara en agua:metanol:ácido acético (1:1:1, v/v). Esta preparación adquirió una consistencia semejante a la de un coloide tipo sol y tardó 24 horas a -20°C para adquirir una apariencia totalmente homogénea. La suspensión es clara y un poco más viscosa que la mezcla de disolventes. Las proteínas no se sedimentaron por centrifugación a $5,000 \times g$ durante una hora, aun después de mantenerse por una semana a -20°C . Una muestra de esta proteína (5 mg/mL) se reconstituyó con DAG y PC disueltos en benceno. La actividad total de la DAG-AT presente en los LB representa un 55 y un 15 % de la actividad total de la fracción microsomal y del extracto crudo, respectivamente (Tablas XI y XII).

Tabla XI. Purificación de la actividad DAG-AT de la fracción microsomal en columna de vidrio poroso. Las fracciones microsomales de embriones maduros de maíz se lavaron con benceno y se resuspendieron en metanol:ácido acético:agua (1:1:1, v/v). Una muestra de 200 μL fue inyectada en una columna de vidrio poroso de 13 mL y fue eluída con la misma mezcla de solventes. Las fracciones eluídas se reconstituyeron con DAG y fosfatidilcolina antes de medir la actividad enzimática. El medio de reacción fue Tris-HCl 0.1 M, pH 7.4, sacarosa 0.084 M, Tween-20 0.02%, MgCl_2 2 mM, ácido palmítico 0.1 mM y [^{14}C]-oleoil-CoA 20 mM (7 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$) en un volumen final de 150 μL .

Paso	Proteína Total mg	Actividad Total nmol min^{-1}	Actividad específica $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$	Rendimiento %
extracto crudo	74.5	817	11	100
microsomas	1.87	215	115	26.3
suspensión clo:met:agua	0.06	2.8	47	0.3
columna vidrio poroso	< 0.005	7	d	0.9

d=desconocido

6.9 Purificación de la DAG-AT por filtración en gel

Hasta el momento hemos obtenido proteína libre de DAG, reconstituida y con actividad DAG-AT derivada de las fracciones microsomales y de los LB. Con el fin de purificar a la DAG-AT de LB se obtuvo una suspensión proteica estable de una mezcla de agua:metanol:ácido acético (1:1:1, v/v) (ver sección 6.8). La suspensión se fraccionó por filtración en gel en una columna de perlas de vidrio poroso de 700 Å.

Se aplicó la suspensión proteica de LB (0.2 mL) a la columna y se eluyó con la misma mezcla de disolventes (26 mL). Se detectó proteína por absorbancia a 280 nm y se midió actividad de DAG-AT. El perfil de elución de la actividad recuperada de las fracciones de la columna de vidrio se observó en un pico detrás del pico principal de absorbancia (Fig. 35a). Muchas de las proteínas fueron eluidas en un solo pico del volumen de lavado (cerca del tamaño de exclusión teórico de 30,000 kDa). Este resultado sugiere que la suspensión contiene agregados de alta masa molecular, sin embargo, el espectro de absorbancia muestra un pico amplio con la máxima absorbancia a 284 nm (datos no mostrados). Es posible que en este pico haya proteínas con el benceno remanente de los lavados para remover los lípidos. Pero el benceno tendría que estar ligado a la proteína a considerar por el peso molecular de la fracción (que correspondería al volumen de exclusión).

Tabla XII. Purificación de la actividad DAG-AT de cuerpos lipídicos en columna de vidrio poroso. Los cuerpos lipídicos de embriones maduros de maíz se lavaron con benceno y se resuspendieron en metanol:ácido acético:agua (1:1:1, v/v). Una muestra de 200 μ l fue inyectada en una columna de vidrio poroso de 13 mL y fue eluída con la misma mezcla de solventes. Las fracciones eluidas se reconstituyeron con DAG y fosfatidilcolina antes de medir la actividad enzimática. El medio de reacción fue Tris-HCl 0.1 M, pH 7.4, sacarosa 0.084 M, Tween-20 0.02%, MgCl₂ 2 mM, ácido palmítico 0.1 mM y [¹⁴C]-oleoil-CoA 20 mM (7 μ Ci/mmol) en un volumen final de 150 μ L.

Paso	Proteína Tc mg	Actividad Tot: nmol min ⁻¹	Actividad especí nmol min ⁻¹ mg	Rendimier %
extracto crudo	74.5	817	11	100
cuerpos lipídicos	2	d	< 1	
suspensión clor:meta:agua	1	119	119	100
columna vidrio poroso	< 0.005	506	d	425

d=desconocido

También con la finalidad de purificar a la DAG-AT se obtuvo una suspensión proteica radiactiva de fracciones microsomales en una mezcla de agua:metanol:ácido acético (1:1:1, v/v). En un estudio previo (Pacheco-Moisés, *et al.*, 1997a) se obtuvo proteína microsomal radiactiva en ciertas condiciones por lo que en este estudio se incubaron embriones de maíz con ácido abscísico, alto potencial osmótico (manitol) y 2-[¹⁴C]-acetato (10 μ Ci) durante 12 horas. La proteína derivada de esta fracción microsomal se aplicó a la columna de vidrio poroso. Las fracciones eluidas de la columna se contaron en centelleo líquido y se les midió la actividad. La Figura 35b muestra un solo pico de actividad DAG-AT con al menos el mismo volumen de elución encontrado anteriormente (Fig. 35a) y coincide con un pequeño pico de radiactividad. Los resultados indican que la DAG-AT es poco abundante y la marca radiactiva es muy pobre. Como ocurrió antes, el total de actividad recuperada en el pico fue tan alta como la muestra inyectada a la columna. El rendimiento de la purificación desde el extracto crudo fue muy bajo (Tabla XI). También, se intentó marcar con radiactividad con mayor eficiencia a la proteína de los LB o de la fracción microsomal al provocar una caída de su actividad en los embriones y luego su reinducción. Para ello, basados en lo reportado por Pacheco-Moisés, *et al.*, 1997b, se incubaron los embriones hasta 12 horas en un medio que no contenía ABA o manitol y se transfirieron a un medio con ABA y 500 mM de manitol por 48 horas y en presencia de acetato marcado por 24 horas más. Sin embargo, no se incorpora más radiactividad en la proteína. Esta última observación sugiere que la actividad recuperada inducida por el bajo potencial osmótico y ABA no expresa DAG-AT *de novo*. Se requieren de mayores estudios para aclarar este aspecto, pero ya no se consideró pertinente para el presente trabajo.

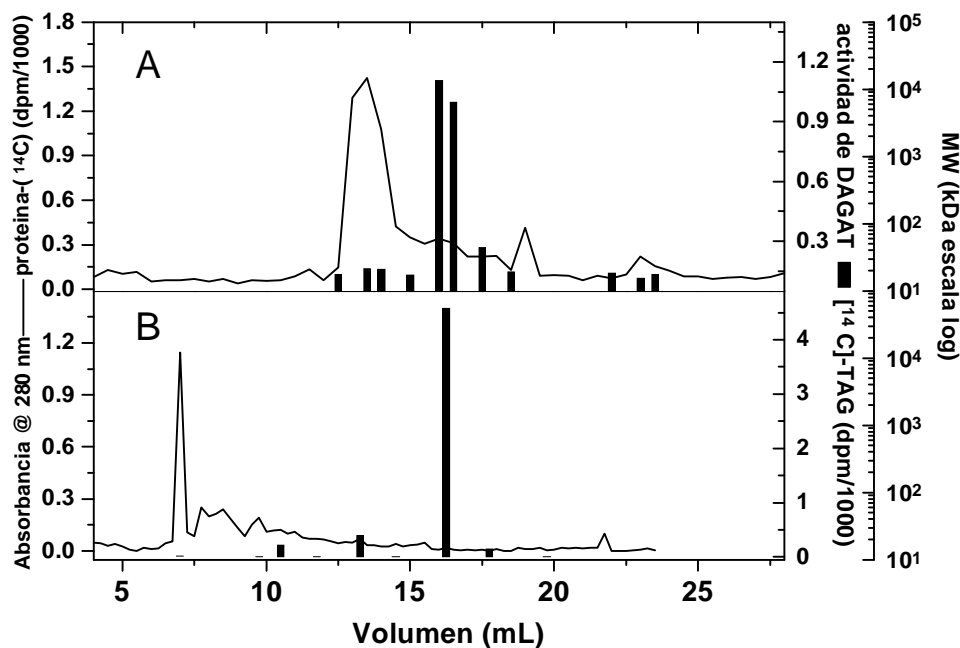


Figura 35. Perfil de elución de proteína de cuerpos lipídicos (A) y microsomas (B) en una columna de vidrio poroso de 700 Å. Las fracciones microsomales y los cuerpos lipídicos de maíz fueron lavados hasta cuatro veces con benceno y resuspendidos en una mezcla de metanol:ácido acético:agua, 1:1:1 v/v. La suspensión protéica se inyectó y eluyó de la columna con la misma mezcla de solventes. La proteína se detectó por la marca radiactiva (A) y por absorción UV (B).

La masa molecular de DAG-AT se estimó corriendo estándares de proteína en la columna de vidrio poroso con un amortiguador de fosfatos (0.15 M, pH 7.2) como eluyente. La DAG-AT tiene un peso de 100 kDa suponiendo que la mezcla de disolventes en la columna de vidrio no altera el comportamiento hidrodinámico de las proteínas en la columna. La absorbancia de las fracciones con actividad de DAG-AT fue inferior al límite de detección del equipo y la cantidad de proteína presente en esta muestra no pudo ser cuantificada por ninguno de los métodos clásicos (Bradford, 1976; Lowry, *et al.*, 1951 o ácido bicinónico, Smith, *et al.*, 1985). Tampoco fue posible visualizar una banda de proteína en un gel de SDS-PAGE elaborado según el método de Laemli (1970) ello aún después de concentrar una fracción completa y aplicarla al pozo del gel, mismo que fue revelado por tinción con nitrato de plata.

Podemos decir que el rendimiento del procedimiento de purificación es bastante pobre y quizá la pureza de la preparación sea alta, ya que hay actividad con muy poca proteína. Infortunadamente, no hay por el momento mejores procedimientos reportados. Adicionalmente, a juzgar por la cantidad de proteína recuperada, es bastante posible que esta enzima sea de baja abundancia.

7 DISCUSIÓN

Tradicionalmente la actividad de DAG-AT se determina cuantificando la incorporación de precursores radiactivos en TAG, el producto de la reacción (Fig. 18, sección 5.2.6). En este trabajo, se desarrolló un método en el que no se utilizaron radioisótopos para la medición de la actividad aciltransferasa al que llamamos MEAC. Este método sencillo tiene un límite de detección muy bajo comparable al método con radioisótopos (Fig. 20). El método se basa en la cuantificación de CoA, otro de los productos de la actividad aciltransferasa (Figs. 18 y 19). Este sistema posee las siguientes ventajas en comparación con el método con radioisótopos:

- Tiene un límite de detección muy bajo, casi comparable con el método con radioisótopos, debido a que se detectan del orden de los picomoles de CoA (Fig. 21 y Tabla V).
- Elimina los problemas asociados al manejo de desechos radiactivos.
- Reduce de manera importante el tiempo requerido para conocer el resultado.
- Reduce la manipulación, limitando las fuentes de error experimental.
- No es afectado por la presencia de nucleótidos y proteínas reducidas (elevada especificidad de la PAT y la CS por la CoA, Michal y Bergmeyer, 1989).
- No tiene interferencia apreciable por los diversos compuestos empleados en el manejo de la muestra, tales como: cloroformo, metanol, 2- β -mercaptoetanol, TCA, HCl, DTT y acyl-CoA (Tabla IV).
- Adicionalmente, puede realizarse en paralelo con el ensayo con radioisótopos, lo que permite comprobar la estequiometría de liberación de los productos que debe ser 1:1, a menos que otras aciltransferasas dependientes de CoA, o algunas tioesterasas estén actuando en el medio de ensayo (Tabla V).

La DAG-AT de varios tejidos no se ha purificado a homogeneidad hasta la fecha, el conocimiento de su actividad se debe al estudio de preparaciones microsomales crudas o fracciones solubilizadas con diferente grado de pureza. En este trabajo se trató de purificar la DAG-AT de embriones en desarrollo de maíz de acuerdo a dos reportes previos de esquemas de purificación parcial de la actividad de DAG-AT. El protocolo de purificación propuesto por Kwanyuen y Wilson (1986) no se reprodujo debido a que la proteína microsomal eluída de una columna de DEAE pierde casi totalmente la actividad con la adición de CHAPS (Fig. 23), mientras que con el protocolo de Little y colaboradores (1994) se recuperó solamente el 1% de la actividad de DAG-AT inicial en una fracción aún bastante impura (Fig. 24). Ambos métodos fueron inadecuados para la caracterización detallada de la proteína.

Los reportes de la solubilización de DAG-AT se basan en el uso de detergentes. Inicialmente, en este trabajo se intentó obtener enzima solubilizada con detergentes para purificarla; sin embargo, nuestros datos indican que los 13 detergentes usados para la solubilización son un procedimiento inadecuado para purificarla debido a los escasos rendimientos encontrados (entre 2.5 y 0.5 % de la actividad inicial, Fig. 25) y a que las preparaciones contiene abundantes cantidades de DAG y TAG (Fig. 28). Además, la actividad de la enzima aumenta si se dializa, sin embargo, no permanece soluble, se incrementa la turbidez de la solución y se sedimenta con ultracentrifugación. Esto sugiere que las preparaciones solubilizadas son partículas coloidales de lípidos y de proteína. Es evidente que los tratamientos con detergentes afectan de manera importante la actividad de la enzima, sin embargo, no es claro si el detergente altera la estructura nativa de la proteína, si tiene algún efecto sobre los lípidos de la membrana asociados a la enzima y que pudieran ser requeridos para la actividad o si su presencia interfiere con las medidas de actividad posteriores.

En los ensayos de la actividad de DAG-AT se mostró que la ausencia de DAG micelar no modificó la actividad de la enzima (Tabla VI) independientemente de que se utilice dipalmitoil diacilglicerol o dioleoil diacilglicerol (datos no mostrados). También se demostró que el DAG endógeno fue suficiente para medir la actividad. En concordancia se sabe que hay gran cantidad de DAG en la fracción microsomal de semillas (Perry y Harwood, 1983) y que la actividad de la DAG-AT es lineal sólo hasta los cinco minutos de reacción (Pacheco-Moisés *et al.*, 1997; Cao y Huang, 1993; Weselake 2000). En todos los casos las concentraciones de DAG empleadas en el ensayo de la actividad de DAG-AT son muy superiores a la cantidad de TAG producidas (más de 100 veces). Estos datos nos llevan a pensar que en los microsomas la DAG-AT no tiene acceso al DAG exógeno para la formación de TAG. Así, el hecho de que la enzima utilice preferentemente el sustrato endógeno y no el adicionado en forma micelar sugiere que la asociación entre la proteína y el DAG tiene características fisicoquímicas distintas a la de las micelas de DAG-detergente-proteína.

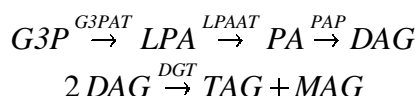
El uso preferencial del sustrato endógeno *in vitro* también se ha observado con la acil-CoA:colesterol aciltransferasa (Smith, *et al.*, 1996) incluso esta preferencia no excluye por completo la utilización del sustrato exógeno. Se derivan dos preguntas: (1) ¿cuánto del TAG proviene del DAG/tween agregado al medio de reacción y cuánto del DAG endógeno? y (2) ¿toda la radiactividad incorporada al TAG desde el [¹⁴C]-oleoilCoA marcado es el resultado de la actividad de la DAG-AT? Para aproximarnos a la respuesta a dichas preguntas en este trabajo se deslipidó, reconstituyó y se midió la actividad de DAG-AT con su sustrato añadido de diferentes maneras.

La actividad de DAG-AT disminuyó a medida que se extraían los lípidos en los diferentes tratamientos con disolventes (Fig. 29) y no se incrementó con la adición de micelas de tween/DAG (Fig. 30). Esto sugiere que la cantidad de DAG empleado proveniente de las micelas es despreciable, a diferencia del caso de la acil-CoA:colesterol aciltransferasa. En contraste, nuestros experimentos muestran que el DAG es accesible a la DAG-AT cuando se aplica en benceno directamente a la proteína liofilizada, lo que concuerda con lo reportado por Vogel y Browse (1996). Dicho tratamiento permitió la recuperación casi total de la actividad, especialmente si se incluye PC junto con el DAG. Estos resultados indican que la pérdida de actividad no es resultado de la desnaturalización irreversible de la enzima sino de la eliminación del sustrato DAG que verdaderamente es accesible a la proteína durante el ensayo.

La forma en la que se incluye al DAG en el ensayo para la detección de la actividad de la DAG-AT ha demostrado ser relevante desde el descubrimiento de la enzima en tejidos animales (Weiss, 1960). En este trabajo encontramos un método para extraer el DAG endógeno y reconstituir a la enzima con DAG y PC (Fig. 31, Tabla X). Con esta herramienta evidenciamos la capacidad de DAG-AT para utilizar el DAG (endógena o DAG/tween) midiendo la actividad con diferentes precursores marcados. Los resultados de estos experimentos confirman la preferencia de la enzima por el DAG endógeno presentado como DAG/PC (Fig. 33, Tabla IX) o sorprendentemente con una actividad mayor con [¹⁴C]-DAG/ tween o [¹⁴C]-DAG/ MEGA-8 (Tabla VIII-X). Nuestros datos indican claramente que el sustrato empleado es el que se incorpora íntimamente a la proteína con el disolvente orgánico y no el añadido como micelas con tween. Al mismo tiempo, surgen preguntas acerca de la validez de la caracterización de la especificidad de la DAG-AT por los DAG y sobre su cinética, reportada en diferentes estudios publicados, por lo que este trabajo abre la posibilidad de reexaminar estos aspectos.

Es posible que parte del [¹⁴C]-TAG recuperado como producto de la DAG-AT pudiera haber sido producido por la acción combinada de otras enzimas como la LPA-AT, la PAP y la DGT (según la serie de reacciones mostrada en el Esquema 1) debido a que están presentes en la fracción microsomal (Cao y Huang, 1993; Pacheco-Moises, 1997 y Stobart *et al.*, 1997). Además, se ha demostrado que en extractos provenientes de tejidos animales ensayados *in vitro*, el 2-monoacilglicerol producido en la reacción de transacilación es rápidamente utilizado para la síntesis de TAG (Lehner y Kuksis, 1996).

En este trabajo la cantidad de monoacilglicerol en la fracción microsomal de maíz detectada fue muy baja (Fig. 28 y 29) y la actividad de DAG-AT es entre 10 y 50 veces más activa que la DGT. Adicionalmente, la estequiometría de formación de TAG y de CoA libre encontrada en los ensayos de la actividad DAG-AT fue cercana a uno (Tabla V). La acción combinada de otras actividades debería alterar este resultado, puesto que una parte de la marca incorporada debería quedar en otros intermediarios y, en consecuencia, la cantidad de TAG recuperada sería menor a la CoA liberada. Aún cuando identificamos otros lípidos neutros marcados radiactivamente generados del ensayo de la DAG-AT, la marca radiactiva fue muy baja comparada con la de TAG (datos no mostrados). Lo anterior nos indica que la presencia de otras enzimas no es mayoritariamente responsable de la formación de TAG.



Esquema 1.-Formación de TAG sin la participación de DAG-AT. G3P=glicerol-3-fosfato, LPA=lisofosfatidato, PA=fosfatidato, DAG=diacilglicerol, TAG=triacilglicerol, MAG=monoacilglicerol, G3PAT=glicerol acil transferasa, LPAAT=lisofosfatidato aciltransferasa, PAP=fosfatidato fosfatasa y DGT=diacilglicerol transacilasa

Una contribución adicional de este trabajo fue la detección de actividad de DAG-AT en los LB. Únicamente se demostró la actividad DAG-AT en los LB de semillas maduras de maíz deslipidados y reconstituídos. Este hallazgo es consistente con los reportes de la presencia de DAG-AT en fracciones del ER de baja densidad aislada de semillas de colza (Lacey y Hills, 1996) y en los LB del hongo oleaginoso *M. ramanniana* (Kamisaka y Nakahara, 1994). Esto nos demuestra que la DAG-AT no se degrada durante las etapas del desarrollo de la semilla y probablemente su regulación se ejerce a través del acceso al DAG. También esta particularidad permite postular la existencia de pozas de DAG separadas; una exclusiva para síntesis de TAG y otra para la síntesis de fosfolípidos (Perry y Harwood, 1993a y Cao y Huang, 1986). Este planteamiento sugiere que la semilla puede discriminar entre los DAG con ácidos grasos no membranales (para lípidos de reserva) y los compatibles con la función y estructura membranal. En este sentido, es muy interesante que en los TAG que acumula *A. thaliana* se encuentren ácidos grasos inusuales al tiempo que son excluidos de las membranas si se introducen y sobreexpresan desaturasas y tioesterasas (Dahlqvist, *et al.* 1998). Así, el mecanismo de discriminación entre estos diferentes tipos de ácidos grasos parece ser un mecanismo general que opera aún con ácidos grasos que *A. thaliana* no producía antes de la introducción del transgen. Es factible que tal característica esté vinculada a este mecanismo para la formación de pozas separadas de DAG. También se abren posibilidades tecnológicas, los LB pueden ser empleados como una fuente de DAG-AT para la síntesis de formas de TAG con ácidos grasos de origen sintético que tuviesen interés aplicado.

Este trabajo demuestra que la DAG-AT tiene ciertas particularidades. La DAG-AT es muy resistente, su actividad se mantuvo liofilizándola y tratándola con varios disolventes incluso resuspendiéndola en una mezcla de disolventes para la cromatografía en perlas de vidrio poroso. Si bien el peso molecular de DAG-AT se estimó de 100 kDa este dato es incierto debido a las limitaciones de emplear disolventes orgánicos y la elevada porosidad de las perlas de vidrio en la cromatografía. La proteína se detectó solamente por su absorbancia en UV probablemente se debe a que la tinción con plata de los geles de SDS-PAGE, los reactivos de Bradford y Bicinonínico o los intentos de marcaje con isotiocianato de fluoresceína no tuvieron el límite de detección adecuado para revelar la proteína. La interpretación a estos datos es que la DAG-AT es poco abundante con una k_{CAT} elevada. Se requieren de más estudios para resolver estas interrogantes si bien consideramos que los datos presentados aquí son un importante paso para el conocimiento de ésta enzima en plantas. Por último, hasta ahora se reportó que el gen de DAG-AT no se expresa adecuadamente en sistemas bacterianos por lo que consideramos que su sobreexpresión en un sistema heterólogo (en levadura, en hongos o en células vegetales en cultivo) puede ser una alternativa para estudios futuros.

8 CONCLUSIONES

- Se desarrolló un método de medición de la actividad aciltransferasa sencillo, con un límite de detección muy bajo en ausencia de precursores radiactivos y que puede realizarse al mismo tiempo con el método con radioisótopos.
- Se obtuvo una preparación de DAG-AT impura con el 1% de la actividad inicial de la fracción microsomal de embriones en desarrollo de maíz tratado de acuerdo a dos esquemas de reportados para la purificación de DAG-AT de cultivos de microsporas de colza y de cotiledones de soya.
- El uso de los diferentes detergentes para la solubilización es un procedimiento inadecuado para purificar la DAG-AT de embriones de maíz debido a los rendimientos muy bajos encontrados (entre 2.5 y 0.5 % de la actividad inicial).
- Las fracciones solubles derivadas de los esquemas de purificación o de los tratamientos con detergentes contienen diacilglicerol y la actividad de DAG-AT es igual en presencia o ausencia del diacilglicerol en el medio de reacción.
- La DAG-AT de embriones y de cuerpos lipídicos de maíz utiliza el diacilglicerol incorporado íntimamente a la proteína (el endógeno o el aplicado en benceno).
- El diacilglicerol disuelto en benceno y con fosfatidilcolina, con tween-20 o con MEGA-8 es accesible a la DAG-AT en fracciones microsomales y en cuerpos lipídicos deslipidados.
- La DAG-AT es activa en cuerpos lipídicos deslipidados y reconstituidos aunque poco abundante.
- La actividad de DAG-AT se mantuvo liofilizándola y tratándola con varios disolventes incluso resuspendiéndola en una mezcla de disolventes para la cromatografía en perlas de vidrio poroso.

8 LITERATURA CITADA

- Akao, T. y Kusaka, T. 1976 Solubilization of diglyceride acyltransferase from the membrane of *Mycobacterium smegmatis*. *J. Biochem.* (Tokio). **80**:723-728
- Altuzar-Martínez. M. 2000 Estudios sobre el control de la síntesis de lípidos de reserva por la disponibilidad de ácidos grasos en embriones inmaduros de maíz (*Zea mays*). Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM, México, D.F. 78 pp.
- Andersson, M.; Wettsten, M.; Borén, J.; Magnusson, A.; Sjöberg, A.; Rustaeus, S. y Olofsson, S. O. 1994 Purification of diacylglycerol acyltransferase from rat liver to near homogeneity. *J. Lipid Res.* **35**:535-545
- Babayan, V. K. 1974 Modification of food to control fat intake. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **51** (6): 260-264
- Baldo, A.; Sniderman, A. D.; St-Luce, S.; Avramoglu, R. K.; Maslowska, M.; Hoang, B.; Monge, J. C.; Bell, A.; Mulay, S. y Cianflone, K. 1993 The adipin-acylation stimulating protein system and regulation of intracellular triglyceride synthesis. *J. Clin. Invest.* **92**(3):1543-1547
- Banerjee, P.; Joo, J. B. y Dawson, G. 1995 Differential solubilization of lipids along with membrane proteins by different classes of detergents. *Chem. Phys. Lipids.* **77**(1):65-78
- Bao, X. y Ohlrogge, J. 1999 Supply of fatty acid is one limiting factor in the accumulation of triacylglycerol in developing embryos. *Plant Physiol.* **120**(4):1057-1062
- Bell, R. M. y Coleman, R. A. 1983 Enzymes of triacylglycerol formation in mammals. The Enzymes. Vol. XVI. pp. 87-111
- Bewley, J. D. y Black, M. 1994 Seeds. Physiology of seed development and germination. 2a Ed. Plenum Press, New York and London. 445pp.
- Borroto, K. y Dure, L. 1987 Some biochemical aspects about seed development. *Plant Mol. Biol.* **8**:113-131
- Boukhchina, S.; Kallel, H.; Gristi, J. y Bézard, J. 1998 Evolution of the different types of sunflower oil triacylglycerols during the seed maturation. En: Advances in plant lipid research, Sevilla, España. pp. 12-14
- Bouvier-Navé, P.; Benveniste, P.; Noiriel, A. y Schaller, H. 2000a Expression in yeast of an acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase cDNA from *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. Society Trans.* **28**(6):692-695
- Bouvier-Navé, P.; Benveniste, P.; Oelkers, P.; Sturley, S. L. y Schaller, H. 2000b Expression in yeast and tobacco of plant cDNAs encoding acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase. *Eur. J. Biochem.* **267**:85-96
- Bradford, M.M. 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254
- Buchanan, B. B.; Gruissem, W. y Jones, R. L. 2000 Biochemistry and Molecular Biology of plants. 1a Ed. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, U. S. A. 1367pp.
- Byers, S. D.; Laroche, A. y Weselake, R. J. 1998 Probing the regulation of diacylglycerol acyltransferase from microspore-derived cell suspension cultures of oilseed rape. En: Advances in plant lipid research, Sevilla, España. pp. 191-193
- Cao, Y. y Huang, A. H. C. 1986 Diacylglycerol acyltransferase in maturing oil seed of maize and other species. *Plant Physiol.* **82**:813-820

- Cao, Y. y Huang, A. H. C. 1987 Acyl Coenzyme A preference of diacylglycerol acyltransferase from the maturing seeds of *Cuphea*, maize, rapessed and canola. *Plant Physiol.* **84**:762-765
- Cases, S.; Smith, S. J.; Zheng, Y. W.; Myers, H. M.; Lear, S. R.; Sande, E. R.; Novak, S.; Collins, C.; Welch, C. B.; Lusic, A. J.; Erickson, S. K. y Farese, R. V. Jr. 1998b Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**(22):13018-13023
- Cases, S.; Smith, S. J.; Zheng, Y. W.; Myers, H. M.; Sande, E. R.; Novak, S.; Lear, S. R.; Erickson, S. K. y Farese, R. V. Jr. 1998a Cloning and expression of a candidate gene for diacylglycerol acyltransferase. *FASEB J.* **12**(5):A814. Part 2. Suppl 5
- Cases, S.; Stone, S.; Zhou, P.; Yen, E.; Tow B.; Lardizabal, K. D.; Voelker, T. y Farese Jr., R. V. 2001 Cloning of DGAT2, a second mammalian diacylglycerol acyltransferase, and related family members. *J. Biol. Chem.* **276**(42):38870–38876
- Chen, J. C. F.; Tsai, C. C. Y. y Tzen, J. T. C. 1999 Cloning and secondary structure analysis of caleosin, a unique calcium-binding protein in oil bodies of plant seeds. *Plant Cell. Physiol.* **40**(10):1079-1086
- Cheng, D.; Meegalla, R. L.; He, B.; Cromley, D. A.; Billheimer, J. T. y Young, P. R. 2001 Human acyl-coa:diacylglycerol acyltransferase is a tetrameric protein. *Biochem. J.* **359**:707-714
- Christiansen, K. 1979 Utilization of endogenous diacylglycerol for the synthesis of triacylglycerol, phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine by lipid particles from baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Biochim. Biophys. Acta.* **574**:448-460
- Cianflone, K. 1997 The acylation stimulating protein pathway: clinical implications. *Clin. Biochem.* **30**(4):301-312
- Colowick , S. P. y Kaplan, O. M. 1969 Methods in Enzymology. Lipids. Vol XIV. John M. Lowenstein Ed. pp. 604-617
- Dahlqvist, A.; Banas, A. y Stymne, S. 1998 Selective accumulation of uncommon fatty acids into triacylglycerols. En: Advances in plant lipid research, Sevilla, España. pp. 211-214
- Dahlqvist, A.; Ståhl, U.; Lenman, M.; Banas, A.; Lee, M.; Sandager, L.; Ronne, H. y Stymne, S. 2000 Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase: An enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants. *PNAS.* **97**(12):6487-6492
- Davoren, J. D.; Nykiforuk, C.; Laroche, A y Weselake, R. 2002 Sucrose-induced changes in the transcriptome of cell suspension cultures of oilseed rape reveal genes associated with lipid biosynthesis. *Plant Physiol. Biochem.* **40**:719–725
- Dure, S. L. 1975 Seed formation. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **26**:259-278
- Eccleston, V. S. y Ohlrogge, J. B. 1998 Expression of lauroyl-acyl carrier protein thioesterase in *Brassica napus* seeds induces pathways for both fatty acid oxidation and biosynthesis and implies a set point for triacylglycerol accumulation. *Plant Cell.* **10**(4):613-621
- Eccleston, V. S.; Cranmer, A. M.; Voelker, T. A. y Ohlrogge, J. B. 1996 Medium-chain fatty acid biosynthesis and utilization in *Brassica napus* plants expressing lauroyl-acyl carrier protein thioesterase. *Planta* **198**(1):46-53
- Esau, K. 1977 Anatomy of Seed Plant. 2a Ed. Canadá. 550 pp.
- Fahn, A. 1982 Plant Anatomy. 3era Ed. Pergamon Press. New York. USA. 554pp.
- Field, F. J. y Mathur, S. N. 1995 Intestinal lipoprotein synthesis and secretion. *Progr. Lipid Res.* **34**(2):185-198

- Finkelstein, R. R. y Somerville, C. R. 1990 Three classes of abscisic acid (ABA)-insensitive mutations of *Arabidopsis* define genes that control overlapping subsets of ABA responses. *Plant Physiol.* **94**(3):1172-1179
- Frandsen, G. I.; Mundy, J. y Tzen, J. T. C. 2001 Oil bodies and their associated proteins, oleosin and caleosin. *Physiologia Plantarum.* **112**:301-307
- Gangar, A.; Karande, A. A. y Rajasekharan, R. 2001 Isolation and localization of a cytosolic 10 S triacylglycerol biosynthetic multienzyme complex from oleaginous yeast. *J. Biol. Chem.* **276**(13):10290-10298
- Giannoulia, K.; Haralampidis, K.; Poghosyan, Z.; Murphy, D. J. y Hatzopoulos, P. 2000 Differential expression of diacylglycerol acyltransferase (DGAT) genes in olive tissues. *Biochem. Society Trans.* **28**(6):695-697
- Griffiths, G. y Harwood, J. L. 1991 The regulation of triacylglycerol biosynthesis in cocoa (*Theobroma cocoa* L.). *Planta.* **184**:279-284
- Griffiths, G.; Stymne, S. y Stobart, A. K. 1988 The utilization of fatty acid substrates in triacylglycerol biosynthesis by tissue-slices of developing safflower (*Carthamus tinctorius* L.) and sunflower (*Helianthus annuus* L.) cotyledons. *Planta.* **173**:309-316
- Haagsman, H. P.; de Hass, C. G. M.; Geelen, M. J. H. y van Golde, L. M. G. 1982 Regulation of triacylglycerol synthesis in the liver. Modulation of diacylglycerol acyltransferase activity *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **257**(18):10593-10598
- Herman, E. M. 1987 Immunogold-localization and synthesis of an oil-body membrane protein in developing soybean seeds. *Planta.* **172**:336-345
- Hobbs, D. H. y Hills, M. J. 2000 Expression and characterization of diacylglycerol acyltransferase from *Arabidopsis thaliana* in insect cell cultures. *Biochem. Society Trans.* **28**(6): 687-689
- Hobbs, D. H.; Lu, C. y Hills, M. J. 1999 Cloning of a cDNA encoding diacylglycerol acyltransferase from *Arabidopsis thaliana* and its functional expression. *FEBS Lett.* **452**(3):145-149
- Hofmann, K. 2000 A superfamily of membrane-bound O-acyltransferases with implications for Wnt signaling. *TIBS.* **25**:111-112
- Hosaka, K.; Schiele, U. y Numa, S. 1977 Diacylglycerol acyltransferase from rat liver microsomes. separation and acyl-donor specificity. *Eur. J. Biochem.* **76**:113-118
- Huang, A. H. C. 1994 Structure of plant seed oil bodies. *Current Opinion in Structural Biology* **4**:493-498
- Huang, A. H. C. 1996 Oleosins and oil body in seeds and other organs. *Plant Physiol.* **110**:1055-1061
- Ichihara, K. 1984 *sn*-Glycerol-3-phosphate acyltransferase in a particulate fraction from maturing safflower seeds. *Arch. Biochem. Biophys.* **232**(2):685-698
- Ichihara, K. y Noda, M. 1980 Fatty acid composition and lipid synthesis in developing safflower seed. *Phytochemistry.* **19**:49-54
- Ichihara, K. y Noda, M. 1982 Some properties of diacylglycerol acyltransferase in a particulate fraction from maturing safflower seeds. *Phytochemistry.* **21**(8):1895-1901
- Ichihara, K.; Takahashi, T. y Fujii, S. 1988 Diacylglycerol acyltransferase in maturing safflower seeds: its influences on the fatty acid composition of triacylglycerol and on the rate of triacylglycerol synthesis. *Biochim. Biophys. Acta.* **958**(1):125-129
- Ide, T. y Murata, M. 1993 The acyl-acceptor specificity of microsomal diacylglycerol acyltransferase as a possible determinant in regulating hepatic triacylglycerol synthesis in rats fed a polyunsaturated fat diet. *J. Nut. Biochem.* **4**(4):229-235

- Jackson, F. M.; Michaelson, L.; Fraser, T. C. M.; Stobart, A. K. y Griffiths, G. 1998 Biosynthesis of triacylglycerol in the filamentous fungus *Mucor circinelloides*. *Microbiology* **144**(9):2639-2645
- Jako, C.; Kumar, A.; Wei, Y.; Zou, J.; Barton, D.; Giblin, M.; Covello, P. y Taylor, D. 2001 Seed-specific over-expression of an Arabidopsis cDNA encoding a diacylglycerol acyltransferase enhances seed oil content and seed weight. *Plant Physiol.* **126**:861-874
- Jiang, L. y Kermod, R. A. 1994 Role of desiccation in the termination of expression of genes for storage proteins. *Seed Science Res.* **4**:149-173
- Kalscheuer, R. y Steinbuechel, A. 2003 A novel bifunctional wax ester synthase/acyl-CoA:Diacylglycerol acyltransferase mediates wax ester and triacylglycerol biosynthesis in *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1. *J. Biol. Chem.* **278**(10):8075-8082
- Kamisaka, Y. y Nakahara, T. 1994 Characterization of the diacylglycerol acyltransferase activity in the lipid body fraction from oleaginous fungus. *J. Biochem.* **116**(6):1295-1301
- Kamisaka, Y. y Nakahara, T. 1996 Activation of detergent-solubilized diacylglycerol acyltransferase by anionic phospholipids. *J. Biochem.* (Tokyo) **119**(3):520-523
- Kamisaka, Y.; Mishra, S. y Nakahara, T. 1997 Purification and characterization of diacylglycerol acyltransferase from the lipid body fraction of an oleaginous fungus. *J. Biochem.* **121**:1107-1114
- Katavic, V. R.; Darwin, W. y Kunst, L. 1995 Alteration of seed fatty acid composition by an ethyl methanesulfonate-induced. Mutation in *Arabidopsis thaliana* affecting diacylglycerol acyltransferase activity. *Plant Physiol* **108** (1): 399-413
- Kaup, M. T.; Froese, C. D. y Thompson, J. E. 2002 A role for diacylglycerol acyltransferase during leaf senescence. *Plant Physiol.* **129**:1616-1626
- Kawasaki, T. y Snyder, F. 1988 Synthesis of a novel acetylated neutral lipid related to platelet-activating factor by acyl-CoA:1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol acyltransferase in HL-60 cells. *J. B.C.* **263**(21):2593-2596
- Ko, J. S.; Rho, M. C.; Chung, M. Y.; Song, H. Y.; Kang, J. S.; Kim, K.; Lee, H. S. y Kim, Y. K. 2002 Quinolone alkaloids, diacylglycerol acyltransferase inhibitors from fruits of *Evodia rutaecarpa*. *Planta Medica.* **68**(12):1131-1133
- Kwanyuen, P. y Wilson, R. F. 1986 Isolation and purification of diacylglycerol acyltransferase from germinating soybean cotyledons. *Biochim. Biophys. Acta* **877**:238-245
- Kwanyuen, P. y Wilson, R. F. 1990 Subunit and amino acid composition of diacylglycerol acyltransferase from germinating soybean cotyledons. *Biochim. Biophys. Acta.* **1039**(1): 67
- Lacey, D. J. y Hills, M. J. 1996 Heterogeneity of the endoplasmic reticulum with respect to lipid synthesis in developing seeds of *Brassica napus* L. *Planta.* **199**:545-551
- Laemmli, U. K. 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685
- Lardizabal, K. D.; Mai, J. T.; Wagner, N. W.; Wyrick, A.; Voelker, T. y Hawkins, D. J. 2001 DGAT2 is a new diacylglycerol acyltransferase gene family purification, cloning, and expression in insect cells of two polypeptides from *Mortierella ramanniana* with diacylglycerol acyltransferase activity. *J. Biol. Chem.* **276**(42):38862-38869
- Lau, T. E. y Rodríguez, M. A. 1996 A protein tyrosine kinase associated with the ATP-dependent inactivation of adipose diacylglycerol acyltransferase. *Lipids* **31**(3):277-283
- Lehner, R. y Kuksis, A. 1993 Triacylglycerol synthesis by an sn-1,2(2,3)-diacylglycerol transacylase from rat intestinal microsomes. *J. Biol. Chem.* **268**(12):8781-8786

- Lehner, R. y Kuksis, A. 1996 Biosynthesis of triacylglycerols. *Prog. Lipid. Res.* **35**(2):169-201
- Little, D.; Weselake, R.; Pomeroy, K.; Furukawa-Stoffer, T. y Bagu, J. 1994 Solubilization and characterization of diacylglycerol acyltransferase from microspore-derived cultures of oilseed rape. *Biochem. J.* **304**:951-958
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Lewis, F. A.; y Randall, R. J. 1951 Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275
- Lozaman, F. J. 1995 *Proc. Western Section Am. Soc. Animal. Sci.* **46**:269-272
- Lu, C. y Hills, M. J. 2002 Arabidopsis mutants deficient in diacylglycerol acyltransferase display increased sensitivity to abscisic acid, sugars, and osmotic stress during germination and seedling development. *Plant Physiol.* **129**:1352-1358
- Lu, L. C.; Bayon, N. S.; Hobbs, D. H.; Kang, J.; Wen, Y.; Krachtus, D. y Hills, M. J. 2003 Expression pattern of diacylglycerol acyltransferase-1, an enzyme involved in triacylglycerol biosynthesis, in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **52**:31-41
- Manganaro, F. y Kuksis, A. 1985 Rapid isolation of a triacylglycerol synthetase complex from rat intestinal mucosa. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* **63**(2):107-114
- Martin, B. A. y Wilson, R. F. 1984 Subcellular localization of triacylglycerol synthesis in spinach leaves. *Lipids.* **18**:117-121
- Mayorek, N. y Bar-Tana, J. 1985 Inhibition of diacylglycerol acyltransferase by 2-bromooctanoate in cultured rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **260**(11):6528-6532
- Mayorek, N.; Grinstein, I. y Bar-Tana, J. 1989 Triacylglycerol synthesis in cultured rat hepatocytes. The rate-limiting role of diacylglycerol acyltransferase. *Eur. J. Biochem.* **182**(2):395-400
- Mi Y. C.; Young, Mun-Chual, R.; Jeong, S. K.; Shi, Y. R.; Kyung, H. J.; Koanhoi, K.; y Young, K. K. 2004 *In vitro* inhibition of Diacylglycerol Aciltransferasa by prenylflavonoids from *Sophora flavescens*. *Planta Med.* **70**:256-258
- Michal, G. y Bergmeyer, H. U. 1989 Coenzyme A, catalytic method with phosphate acetyltransferase. En: Methods of Enzymatic Analysis J. Bergmeyer & M. Graßl, Eds. VCH publishers, Weinheim, Germany, vol. **3**, pp. 169-177
- Miquel, M. y Browse J. 1995 Lipid biosynthesis in developing seeds. En: Seed Development and Germination. Kigel y Galili Eds. pp. 35-47
- Mohr, H. y Schopfer, P. 1995 Plant Physiology. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg. pp. 169-201
- Murphy, D. J.; Rawsthorne, S. y Hills, M. J. 1993 Storage lipid formation in seeds. *Seed Science Research.* **3**:79-95
- Murphy, D. J.; y Vance, J. 1999 Mechanisms of lipid-body formation. *TIBS.* **24**(3):109-115
- Naested, H.; Frandsen, G. I.; Jauh, G. Y.; Hernandez-Pinzon, I.; Nielsen, H. B.; Murphy, D. J.; Rogers, J. C. y Mundy, J. 2000 Caleosins: Ca²⁺-binding proteins associated with lipid bodies. *Plant Mol. Biol.* **44**(4):463-476
- Nykiforuk, C. L.; Furukawa-Stoffer, T. L.; Huff, P. W.; Sarna, M.; Laroche, A.; Moloney, M. M. y Weselake, R. J. 2002 Characterization of cDNAs encoding diacylglycerol acyltransferase from cultures of *Brassica napus* and sucrose mediated induction of enzyme biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1580**:95-109
- Nykiforuk, C. L.; Laroche, A. y Weselake, R. J. 1999 Isolation and sequence analysis of a novel cDNA encoding a putative diacylglycerol acyltransferase from a microspore-derived cell suspension culture of *Brassica napus* L. cv Jet Neuf (PGR99-123). *Plant Physiol.* **120**:1207-1215

- Oelkers, P.; Cromley, D.; Padamsee, M.; Billheimer, J. T. y Sturley S. L. 2002 The *DGA1* gene determines a second triglyceride synthetic pathway in yeast. *J. Biol. Chem.* **277**(11):8877–8881
- Ohlrogge, J. B. 1997 Regulation of fatty acid synthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**:109-136
- Ohlrogge, J. y Browse, J. 1995 Lipid biosynthesis. *Plant Cell.* **7**:957-970
- Ohnishi, M.; Hirose, S.; Kawaguchi, M.; Ito, S. y Fujino, Y. 1990 Chemical composition of lipids, especially triacylglycerol, in grape seeds. *Agric. Biol. Chem.* **54**(4):1035-1042
- Okila, T. W. y Rogers, J. C. 1996 Compartmentation of proteins in the endomembrane system of plant cells. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**:327-350
- Oo, K. C. y Chew, Y. H. 1992 Diacylglycerol acyltransferase in microsomes and oil bodies of oil palm mesocarp. *Plant Cell Physiol.* **33**(2):189-195
- Oo, K. C. y Huang, A. H. C. 1989 Lysofosfatidate acyltransferase activities in the microsomes from palm endosperm, maize scutellum and rapeseed cotyledon of maturing seeds. *Plant Physiol.* **91**:1288-1295
- Owen, M.; Corstorphine, C. y Zammit, V. 1997 Overt and latent activities of diacylglycerol acyltransferase in rat liver microsomes: possible roles in very-low-density lipoprotein triacylglycerol secretion. *Biochem. J.* **323**:17-21
- Ozasa, S.; Kempner, E. S. y Erickson, S. K. 1989 Functional size of acyl coenzyme A: diacylglycerol acyltransferase by radiation inactivation. *J. Lipid Res.* **30**(11):1759-1762
- Pacheco-Moisés, F. 1997b Estudio de la regulación de la síntesis de triacilglicerol por el ácido absícico y el potencial osmótico en embriones de maíz. Tesis de Doctorado. Facultad de Química, UNAM, México, D.F. 92 pp.
- Pacheco-Moisés, F.; Valencia-Turcotte, L.; Altuzar-Martínez, M. y Rodríguez-Sotres, R. 1997a Regulation of acyltransferase activity in immature maize embryos by abscisic acid and the osmotic environment. *Plant Physiol.* **114**:1095-1101
- Perry, H. J. y Harwood, J. L. 1993a Changes in the lipid content of developing seeds of *Brassica napus*. *Phytochemistry.* **32**:1411-1415
- Perry, H. J. y Harwood, J. L. 1993b Use of [²⁻³H]-glycerol precursor in radiolabelling studies of acyl lipids in developing seeds of *Brassica napus*. *Phytochemistry.* **34**:69-73
- Pillai, M. G.; Certik, M.; Nakahara, T. y Kamisaka, Y. 1998 Characterization of triacylglycerol biosynthesis in subcellular fractions of an oleaginous fungus, *Mortierella ramanniana* var. *angulispora*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1393**(1):128-136
- Polokoff, M. A. y Bell, R. M. 1980 Solubilization, partial purification and characterization of rat liver microsomal diacylglycerol acyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta.* **618**:129-142
- Quatrano, S. R. 1990 The roles of hormones during seed development. En: Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development. P. J. Davies. Kluwer Academic Publisher, Ed. The Netherlands
- Rangasamy, D. y Ratledge, C. 2000 Genetic enhancement of fatty acid synthesis by targeting rat liver ATP:citrate lyase into plastids of tobacco. *Plant Physiol.* **122**(4):1231-1238
- Revzin, A. 1994 A practical guide to membrane protein purification. Separation, detection and characterization of biological macromolecules. Academic Press. USA. 166 pp.
- Reyes-Castañeda, P. 1990 El maíz y su cultivo. AGT Ed. México, D.F. 460 pp.
- Rodriguez, M. A.; Dias, C. y Lau, T. E. 1992 Reversible ATP-dependent inactivation of adipose diacylglycerol acyltransferase. *Lipids* **27**(8):577-581

- Rodríguez-Sotres, R. y Black, M. 1993 Quantitative determination of triacylglycerols in plant tissues. *Phytochemical Analysis*. **4**:68-71
- Roesler, K.; Shintani, D.; Savage, L.; Boddupalli, S. y Ohlrogge, J. 1997 Targeting of the *Arabidopsis* homomeric acetyl-coenzyme A carboxylase to plastids of rapeseeds. *Plant Physiol*. **113**(1):75-81
- Routaboul, J.; Benning, C.; Bechtold, N.; Caboche, M. y Lepiniec, L. 1999 The TAG1 locus of *Arabidopsis* encodes for a diacylglycerol acyltransferase. *Plant Physiol. Biochem*. **37**(11):831-840
- Rustan, A. C.; Nosen, J. O. y Christiansen, E. N. 1988 Eicosapentaenoic acid reduces hepatic synthesis and secretion of triacylglycerol by decreasing the activity of acyl-coenzyme A:1,2-diacylglycerol acyltransferase. *J. Lipid Res*. **29**(11):1417-1426
- Sandager, L., Gustavsson, M. H., Ståhl, U., Dahlqvist, A., Wiberg, E., Banas, A., Lenman, M., Ronne, H. y Stymne, S. 2002 Storage lipid synthesis is non-essential in yeast. *J. Biol. Chem*. **277**(8):6478-6482
- Schnurr, J. A.; Shockey, J. y Browse, J. 2000 Characterization of an acyl-CoA synthetase from *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical Society Transactions*. **28**(6): 957-958
- Schoonderwoerd, K.; Broekhover-Schokker, S. y Hulsmann, W. C. 1990 Properties of phosphatidate phosphohydrolase and diacylglycerol acyltransferase activities in the isolated rat heart. Effect of glucagon, ischaemia and diabetes. *Biochem. J*. **268**:487-492
- Settlage, S. B.; Wilson, R. F. y Kwanyuen, P. 1995 Localization of diacylglycerol acyltransferase to oil associated endoplasmic reticulum. *Plant Physiol. Biochem*. **33**(4):399-407
- Seung W. L.; Koanhoi, K.; Mun-Chual, R.; Mi Y. C.; Young, H. K.; Sangku, L.; Hyun, S. L. y Young, K. K. 2004 New polyacetylenes, DAG inhibitors from the roots of *Panax ginseng*. *Planta Med*. **70**:197-200
- Shewry, R. P. 1995 Cereal seed storage proteins. En: Seed Development and Germination. Kigel K. y Galili, G. Ed. Marcel Dekker, Inc. p 45-72
- Sivak, N. M. y Preiss, J. 1995 Starch synthesis in seeds. En: Seed Development and Germination. Kigel, K. y Galili, G. Ed. Marcel Dekker, Inc. pp. 275-332
- Slack, J. R.; Anderton, B. H. y Day, W. A. 1973 A new method for making phospholipid vesicles and the partial reconstitution of the Na⁺, K⁺-activated ATPase. *Bioch. Biophys. Acta* **323**(4):547-559
- Slack, J. R.; Roughan, P. G.; Browse, J. A. y Gardiner S. E. 1985 Some properties of cholinephosphotransferase from developing safflower cotyledons. *Biochim. Biophys. Acta*. **833**(3):438-448
- Smith, J. L.; Madden, L. J. y De Jersey, J. 1996. Effect of exogenous cholesterol and dithiothreitol on the activity of human liver microsomal acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase (ACAT). *Clinica Chimica Acta*. **256**(1):13-25
- Smith, K. P.; Krohn, I. H.; Hermanson, T. G.; Mallia, G. H. F.; Provenzano, D. M.; Fujimoto, K. E.; Goeke, M. N.; Olson, J. B. y Klenk, C. D. 1985 Measurement of protein using bicinonic acid. *Anal. Biochem*. **150**:76-85
- Somerville, C.; Browse, J.; Jaworski, J. G. y Ohlrogge, J. B. 2000 Lipids. En: Biochemistry and Molecular Biology of plants. Buchanan, B., Gruissem, W. y Jones, E Eds. Marylan, U. S. A. pp. 456-527

- Stals, H. K.; Top, W. y Declercq, P. E. 1994 Regulation of triacylglycerol synthesis in permeabilized rat hepatocytes. Role of fatty acid concentration and diacylglycerol acyltransferase. *FEBS Lett.* **343**:99-102
- Steadman, E. R. 1953 The enzymatic synthesis of acyl-CoA compounds. *J. Cell Comp. Physiol.* **41**, 89-107
- Stobart, K. y Stymne, S. 1985 The regulation of the fatty-acid composition of the triacylglycerols in microsomal preparations from avocado mesocarp and the developing cotyledons of safflower. *Planta.* **163**:119-125
- Stobart, K.; Mancha, M.; Lenman, M.; Dahlqvist, A. y Stymne, S. 1997 Triacylglycerols are synthesised and utilized by transacylation reactions in microsomal preparations of developing safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seeds. *Planta.* **203**:58-66
- Stymne, S. y Stobart, K. 1984 Evidence for the reversibility of the acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferase in microsomal preparations from developing safflower (*Carthamus tinctorius* L.) cotyledons and rat liver. *Biochem. J.* **223**:305-314
- Stymne, S. y Stobart, K. 1987 Triacylglycerol Biosynthesis. En: The Biochemistry of Plant. Vol. 9 p. 175-213
- Sukumar, V. y Sastry, P. S. 1987 Triacylglycerol synthesis in developing seeds of groundnut (*Arachis hypogea*): studies on phosphatidic acid phosphatase and diacylglycerol acyltransferase during seed maturation. *Biochem. Int.* **14**(6):1153-1158
- Sun, C.; Cao, Y. y Huang, A. H. C. 1988 Acyl coenzyme A preference of the glycerol phosphate pathway in the microsomes from the maturing seeds of palm, maize and rapeseed. *Plant Physiol.* **88**:56-60
- Tabata, N.; Ito, M.; Tomoda, H. y Ōmura, S. 1997 Xanthohumols, diacylglycerol acyltransferase inhibitors, from *Humulus lupulus*. *Phytochemistry.* **46**(4):683-687
- Tabata, N.; Ohshima, Y.; Tomoda, H.; Abe, T.; Namikoshi, M.; y Ōmura, S. 1999 Structure elucidation of roselipins, inhibitors of diacylglycerol acyltransferase produced by *Gliocladium roseum* KF-1040. *J. Antibiot.* **52**(9):815-826
- Taylor, D. C.; Barton, D. L.; Giblin, E. M.; MacKenzie, S. L.; Van Denberg, C. G. y McVetty, P. B. 1995 Microsomal lyso-phosphatidic acid acyltransferase from a *Brassica oleracea* cultivar incorporates erucic acid into the sn-2 position of seed triacylglycerols. *Plant Physiol.* **109**(2):409-420
- Taylor, D. C.; Weber, N.; Barton, D. L.; Underhill, E. W.; Hogge, L. R.; Weselake, R. J. y Pomeroy, M. K. 1991 Triacylglycerol bioassembly in microspore-derived embryos of *Brassica napus* L. cv Reston. *Plant Physiol.* **97**:65-79
- Taylor, D. C.; Weber, N.; Hogge, L. R.; Underhill, E. W. y Pomeroy, M. K. 1992 Formation of trierucoylglycerol (Trierucin) from 1,2-dierucoil by a homogenate of microspore-derived embryos of *Brassica napus* L. *Journal of the American Oil Chemists' Society.* **69**(4):355-358
- Tomoda, H.; Ito, M.; Tabata, N.; Masuma, R.; Yamaguchi, Y. y Ōmura, S. 1995a Amidepsines, inhibitors of diacylglycerol acyltransferase produced by *Humicola* sp. FO-2942. I. Production, isolation and biological properties. *J. Antibiot.* **48**(9):937-941
- Tomoda, H.; Ohshima, Y.; Abe, T.; Tabata, N.; Namikoshi, M.; Yamaguchi, Y.; Masuma, R. y Ōmura, S. 1999 Roselipins, inhibitors of diacylglycerol acyltransferase, produced by *Gliocladium roseum* KF-1040. *J. Antibiot.* **52**(8):689-694

- Tomoda, H.; Tabata, N.; Ito, M y Ōmura, S. 1995b Amidepsines, inhibitors of diacylglycerol acyltransferase produced by *Humicola sp.* FO-2942. II. Structure elucidation of amidepsines A, B and C. *J. Antibiot.* **48**(9):942-947
- Tomoda, H.; Yamaguchi, Y.; Tabata, N.; Kobayashi, T.; Masuma, R.; Tanaka, H. y Ōmura, S. 1996 Amidepsine E, an inhibitor of diacylglycerol acyltransferase produced by *Humicola sp.* FO-5969. *J. Antibiot.* **49**(9):929-931
- Touchstone, J. C. 1992 Practice of Thin Layer Chromatography. John Wiley Ed. 377 pp.
- Tzen, J. T. C.; Cao, Y.; Laurent, P.; Ratnayake, C. y Huang, A. H. C. 1993 Lipids, proteins and structure of seed oil bodies from divers species. *Plant Physiol.* **101**:267-276
- Tzen, J. T. C.; Lie, G. C. y Huang, A. H. C. 1992 Characterization of the charged components and their topology on the surface of plant seed oil bodies. *J. Biol. Chem.* **267**(22):15626-15634
- Vogel, G. y Browse, J. 1996 Cholinephosphotransferase and diacylglycerol acyltransferase. Substrate specificities at a key branch point in seed lipid metabolism. *Plant Physiol.* **110**:923-931
- Waite, M. y Sisson, P. 1973 Utilization of neutral glycerides and phosphatidylethanolamine by the phospholipase A1 of the plasma membranes of rat liver. *J. Biol. Chem.* **248**(23):7985-7992
- Weiss, S. B.; Kennedy, E. P. y Kiyasu, J. 1960 The enzymatic synthesis of triglycerides. *J. Biol. Chem.* **235**(1):40-44
- Weselake, R. J.; Kazala, E. C.; Cianflone, K.; Boehr, D. D.; Middleton, C. K.; Rennie, C. D.; Laroche, A. y Recnik, I. 2000 Human acylation stimulating protein enhances triacylglycerol biosynthesis in plant microsomes. *FEBS Lett.* **481**(2):189-92
- Weselake, R. J.; Madhavji, M.; Foroud, N.; Szarka, S.; Patterson, N.; Wiehler, W.; Nykiforuk, C.; Burton, T.; Boora, P.; Mosimann, S.; Moloney, L. M. y Laroche, A. 2004 Polyclonal antibodies, AbA and AbB, were ... within either the third predicted luminal loop or second predicted cytosolic loop of bnDGAT1. En: 16 th International Plant Lipid Symposium. Faculty of food science. Budapest, Hungary. pp. 1-7
- Weselake, R. J.; Nykiforuk, C. L.; Laroche, A.; Patterson, N. A.; Wiehler, W. B.; Szarka, S. J.; Moloney, M. M.; Tari, L. W. y Derekh, U. 2000 Expression and properties of diacylglycerol acyltransferase from cell-suspension cultures of oilseed rape. *Biochem. Soc. Trans.* **28**:684-686
- Weselake, R. J.; Pomeroy, M. K.; Furukawa, T. L.; Golden, J. L.; Little, D. B. y Laroche, A. 1993 Development profile of diacylglycerol acyltransferase in maturing seeds of oilseed rape and safflower and microspore-derived cultures of oilseed rape. *Plant Physiol.* **102**(2):565-571
- Weselake, R. J.; Taylor, D. C.; Pomeroy, M. K.; Lawson, S. L. y Underhill, E. W. 1991 Properties of diacylglycerol acyltransferase from microspore-derived embryos of *Brassica napus*. *Phytochemistry.* **30**(11):3533-3538
- Williams, J. P.; Imperial, V.; Khan, M. U. y Hodson, J. N. 2000 The role of phosphatidylcholine in fatty acid exchange and desaturation in *Brassica napus* L. leaves. *Biochem. J.* **349**:127-133
- Williamson, J. R. y Corkey B. E. 1979 Assay of citric acid cycle intermediates and related compounds. Update with tissue metabolite levels and intracellular distribution. En: Methods in Enzymology S.P. Colowick & N.O. Kaplan, Ed. Academic Press, New York. Vol. 55 pp. 200-222
- Wong, C. H. y Whitesides, G. M. 1994 Enzymes in synthetic organic chemistry. Oxford, United Kingdom : Pergamon. 370 pp.

- Zou, J.; Brokx, S. J. y Taylor, D. C. 1996 Cloning a cDNA encoding the 21.2 kDa oleosin isoform from *Arabidopsis thaliana* and a study of its expression in a mutant defective in diacylglycerol acyltransferase activity. *Plant Mol. Biol.* **31**:429-433
- Zou, J.; Brokx, S. J. y Taylor, D. C. 1996 Cloning a cDNA encoding the 21.2 kDa oleosin isoform from *Arabidopsis thaliana* and a study of its expression in a mutant defective in diacylglycerol acyltransferase activity. *Plant Mol. Biol.* **31**:429-433
- Zou, J.; Wei, Y.; Jako, C.; Kumar, A.; Selvaraj, G. y Taylor, D. C. 1999 The *Arabidopsis thaliana* TAG1 mutant has a mutation in a diacylglycerol acyltransferase gene. *Plant J.* **19**(6):645-653

ANEXO 1

Detergentes comerciales típicamente utilizados para la extracción de proteínas membranales y utilizados en el presente trabajo para la extracción de la DAG-AT de la fracción microsomal de embriones inmaduros de maíz.

NOMBRE COMERCIAL	NOMBRE	CARGA	FÓRMULA	P.M.	cmc (mM)	n
1.- BRIJ 35	Polioxietilen-23-Lauril Eter	no iónico	$C_{12}E_{23}$	1225.0	0.05-0.1	40
2.- CHAPS	3-[(3-Colamidopropil)-dimetil-amonio]-1-propano sulfonato	zwiteriónico	$C_{32}H_{58}N_2O_7S$	614.9	0.49	4-14
3.- CTAB	Trimetilamonio bromuido cetrimida	catiónico	$C_{16}-N^+(CH_3)_3$	365.0	1.0	170
4.- Deoxicolato de Na	3 α -12 α -dihidroxi 5 β colan-24-oato	aniónico	$C_{24}H_{39}O_4Na$	414.6	5.0	10
5.- MEGA-8	Octanoil-N-metilglucamida	no iónico	$C_{15}H_{31}NO_6$	321.4	60.0	
6.- n-Octil-b-D-glucopiranosido	N-Octil- β -D-Glucósido	no iónico	$C_{14}H_{28}O_6$ $C_7H_6O_6S \cdot 2H_2O$	292.4 254.22	15.0	30-100
7.- Nonidet P-40	Igepal	no iónico		602.8	0.29	149
8.- PPEG-25	Polioxietilen 25 propilenglicol esterato	no iónico				
9.- SDS	Dodecil sulfato de sodio	aniónico	$CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$	288.38	10.0	60-100
10.- Tritón X-100	Polietilenglicol teroctil fenileter	no iónico	t-Oct- $C_6H_4-(OCH_2-CH_2)_xOH$ x=9-10	625.0	0.24	140
11.- Tritón X-114	Octilfenoxipolietoxietanol	no iónico	t-Oct- $C_6H_4-(OCH_2-CH_2)_xOH$ x=7-8	537.0	0.2	100-155
12.- Tween 20	Polioxietilen sorbitan monolaurato	no iónico	50% ácido laurico+ácido palmítico, mirístico y esteárico	1228.0	0.06	
13.- Tween 80	Polioxietilen sorbitan monooleato	no iónico	70% ácido oleico+ ácido palmítico y esteárico	1310.0	0.012	58

pm=peso molecular

cmc=concentración micelar crítica

n=número de agregación

- 1.- Tobimatsu, T. *et al.* 1997 Heterologous expression, purification and properties of diol dehidratase: an adenosyl cobalamin dependent enzyme of *Klebsiella oxytoca*. *Arch. Biochem. Biophys.* **347**:132-142
- 2.- Cladera, J. *et al.* 1997 Liposome solubilization and membrane reconstitution using CHAPS and CHAPSO. *Eur. J. Biochem.* **243**:798-812
- 3.- Helenius, S. 1975 Solubilization of membranes by detergents. *BBA* **415**:29-79
- 4.- Storrie, B. y Madden, E. A. 1990 Isolation of subcellular organelles. *Meth. Enzymol.* **182**:203-225
- 5.- Little, D. *et al.* 1994 Solubilization and characterization of diacylglycerol acyltransferase from microspore-derived cultures of oilseed rape. *Biochem. J.* **304**:951-958
- 6.- Stubbs, G. W. 1976 Non ionic detergent with no absorbance at 228 nm, best suited for the solubilization and isolation of membrane protein. *Biochim. Biophys. Acta.* **426**:46-50
- 7.- Springer, T. A.; Mann, D. L.; Defranco, A. y Strominger J. 1977 Detergent solubilization, purification, and separation of specificities of HLA antigens from a cultured human lymphoblastoid line, RPM1 4265. *J. B. C.* **252**(13):4682-4693
- 9.- Henderson, L.E.; Oroszlan, S. y Konigsberg, W. 1979 A micromethod for complete removal of dodecyl sulfate from proteins by ion-pair extraction. *Anal. Biochem.* **93**:153-157
- 10.- Collins, M. L. y Salton, M.R. 1979 Solubility characteristics of *Micrococcus lysodeikticus* membrane components in detergents and chaotropic salts analyzed by immunoelectrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta.* **553**:40-53
- 11.- Bordier, C. 1981 Phase separation of integral membrane proteins in triton X-114 solution. *J. Biol. Chem.* **256**:1604-1607
- 12.- Black, P. N. *et al.* 1987 Purification and characterization of an outer membrane-bound protein involved in long-chain fatty acid transport in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **62**:1412-1419
- 13.- Storrie, B. y Madden, E. A. 1990 Isolation of subcellular organelles. *Meth. Enzymol.* **182**:203-225

ANEXO 2

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DE ÁCIDO BICINCONÍNICO

El método reportado por Smith, K. 1985, el cual se basa en la detección por el reactivo ácido bicinconínico. El bicinconínico, es sensible, estable y altamente específico para Cu^{1+} . Cuando a la proteína es puesta en un medio alcalino que contiene Cu^{1+} , se formar un complejo coloreado entre el enlace peptídico de la proteína y los átomos de Cu^{1+} , resultando un cromóforo estable y altamente coloreado con una absorbancia máxima a 562 nm. Los reactivos que se usan:

REACTIVO A

4,4'-dicarboxi-2,2'-biquinolina o ácido bicinconínico, 1% p/v

Na_2CO_3 , 2% p/v

Tartrato de sodio, 0.16% p/v

NaOH , 0.4% p/v

NaHCO_3 , 0.95% p/v

Se ajusta el pH 11.25 con NaOH 50%

REACTIVO B

sulfato de cobre, 4% p/v

Se prepara una solución que es la mezcla del reactivo A y del reactivo B en la siguiente proporción:

reactivo A:reactivoB 100:2 (v/v)

Para la determinación de las muestras problema hay que considerar la siguiente relación:

solución:muestra 20:1 (v/v)

Cabe mencionar que la muestra puede diluirse con H_2O desionizada hasta 10 veces.

Las muestras se leen una vez que hayan tomado una coloración morada que es más intensa cuanto más proteína exista. Las muestras se leen en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 562nm.

También se puede agregar a la solución el detergente tween 20 1% para que se clarifiquen las muestras (ya que se enturbian debido a la presencia de proteína que puede llegar a interferir con la lectura) pero el color de la reacción con la proteína puede variar hasta hacerse verde esmeralda que se puede leer a los nm indicados.

ANEXO 3

Artículo: Valencia-Turcotte, L. y Rodriguez Sotres R. 2001. The treatment of purified maize oil bodies with organic solvents and exogenous diacylglycerol allows the detection and solubilization of diacylglycerol acyltransferase. *BBA* **1534**:14-26



The treatment of purified maize oil bodies with organic solvents and exogenous diacylglycerol allows the detection and solubilization of diacylglycerol acyltransferase

Lilián Valencia-Turcotte, Rogelio Rodríguez-Sotres *

Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. Universitaria, 04510, Mexico D.F., Mexico

Received 17 May 2001; received in revised form 23 August 2001; accepted 30 August 2001

Abstract

In spite of its importance in the biosynthesis of reserve oils in plants, diacylglycerol acyltransferase (DAGAT, EC 2.3.1.20) has not been purified to homogeneity, and its study has remained incomplete. We found that the microsomal preparations from developing maize embryos contained substantial amounts of endogenous diacylglycerol (DAG). A solubilization procedure for extracting DAGAT from the microsomes (D. Little, R. Weselake, K. Pomeroy, S.T. Furukawa, J. Bagu, *Biochem. J.* 304 (1994)) was ineffective in eliminating the endogenous DAG, even after gel filtration. DAG removal through the preparation of acetone powders from the embryos led to the loss of DAGAT activity. Labelled triacylglycerol (TAG) was produced in the standard DAGAT assay when labelled DAG was supplied in benzene solution to the freeze-dried microsomes and the sample was dried and resuspended in an aqueous buffer. In contrast, no labelled TAG was produced when a similar sample supplied with non-labelled DAG was assayed with emulsified labelled DAG and acyl-CoA. Repeated washing of the microsomal freeze-dried fraction with benzene resulted in a complete loss of DAGAT activity in the standard assay, but the activity was restored by the addition of DAG plus phosphatidylcholine or Tween 20 in benzene. Although DAGAT has been reported to be confined mainly to the endoplasmic reticulum, we found that DAGAT activity was high in the purified oil bodies from both developing and mature maize embryos and was not removed by repeated washing with 6 M urea. The DAGAT activity was restored from delipidated oil bodies and from microsomes after the preparations had been resuspended in methanol/acetic acid/water (1:1:1, v/v). Although most of the proteins in the suspension were eluted as a single peak at the void volume after gel filtration chromatography, DAGAT activity was found in later fractions. SDS-PAGE of the peak activity fraction revealed no protein bands after silver staining, and the finding suggest that DAGAT protein is of low abundance and has a high k_{cat} . © 2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Diacylglycerol acyltransferase; Diacylglycerol; Oil body; Solubilization; *Zea mays*

1. Introduction

Diacylglycerol acyltransferase (DAGAT, EC 2.3.1.20) is the last enzyme in the synthesis of triacylglycerol (TAG) in animals [1] where it was first discovered [2] and has subsequently found to be present in plants [3], bacteria [4–6] and fungi [7]. It

* Corresponding author. Fax: +525-622-53-29.
E-mail address: sotres@servidor.unam.mx
(R. Rodríguez-Sotres).

is the only enzyme in the Kennedy pathway exclusive for the synthesis of TAG [8]. Based on its similarity to cholesterol:acyl-CoA acyltransferase, the gene encoding the human DAGAT has been cloned and expressed in a heterologous system [9], and this has paved the way to the cloning of the gene from *Arabidopsis* [10]. However, the study of the native protein in microsomes still awaits its complete purification from any of these systems. In plants, the substrate affinities and specificities of the plant DAGAT have been examined only casually [8], while its kinetic properties and mechanism, and its chemical catalytic mechanism are virtually unknown. This paper details some of the basic physicochemical properties of the enzyme that provide important clues about why this protein has resisted purification up to date. We believe that the data presented here represent an important step towards a better understanding of this enzyme, at least in plant systems.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Cobs of maize (*Zea mays*, cv. Chalqueño) were bought fresh from local farmers. The age of the seeds was judged from the size of the embryos, their morphology and the state of dryness of the floral remains. Embryos were excised from the seeds and incubated for 24–48 h in MES buffer (pH 5.5) with 30 mM sucrose, 10 μ M abscisic acid and 500 mM mannitol as described elsewhere [11].

Microsomal preparations were obtained as described by Pacheco-Moisés et al. [11]. DAGAT was assayed either as described by Cao and Huang [3] or by the coenzyme A cycling method previously reported [12].

2.2. Acetone powder of maize embryos

The embryos were frozen in liquid nitrogen, ground to a fine powder with a mortar and pestle and the powder was suspended in 10:1 (v/w) acetone previously cooled to -70°C . The powder was filtered through a Whatman 1 paper in a Buchner funnel and washed with another 10 vols. of cold acetone. The acetone was evaporated under dry nitrogen at 4°C ,

and the powder was used for the preparation of a microsomal fraction as described before [11].

Solubilization of DAGAT from the microsomal fraction was performed as described by Little et al. [13] using 1% octanoyl-*N*-methylglucamide (MEGA-8; OMEGA). When indicated, the solubilized protein was purified by gel filtration with 0.1% MEGA-8 as described by Little et al. [13], except that the column used was a Superdex 200 FPLC column (26×120 mm). The activity of DAGAT was recovered as a single peak eluting at the void volume of the column.

2.3. Purification of phosphatidylcholine from commercial soybean lecithin

We purified phosphatidylcholine (PC) by preparative TLC to eliminate contaminating diacylglycerol that is usually present in commercial lecithin preparation. Soybean lecithin from Sigma (St. Louis, MO, USA) was dissolved in chloroform to a concentration of 10 mg/ml, and 0.5 ml were applied to a preparative TLC plate ($200 \text{ mm} \times 200 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$) in a carved lane of 1 mm depth at 1 cm from the bottom of the plate. The plate was developed with chloroform/methanol/ NH_4OH 28%, w/v (65:35:5, v/v). The spot corresponding to PC was identified by exposing one thin stripe of the plate to iodine vapours and its position determined by comparison with that of a pure PC standard from Merck. The silica was scraped off the plate, and the lipid was eluted with 100% chloroform previously dried with a 3 Å molecular sieve (Aldrich, St. Louis, MO, USA). The purified PC was kept in chloroform solution in a desiccator at -70°C until use. The PC preparation was stable under this condition for at least 1 month as judged from its IR spectrum.

2.4. Purification of oil bodies from maize immature embryos

Ten grams of freshly excised maize developing embryos of 25–35 days post pollination were ground in a mortar with pestle in 50 mM Tris-HCl (pH 6.8) and 0.3 M sucrose. The resulting suspension was filtered through four layers of cheesecloth and centrifuged at $10\,000 \times g$ for 20 min. The floating layer was recovered and further purified as described by Tzen et al. [14].

2.5. Preparation of microsomal and oil body delipidated proteins from maize mature seeds

Seventy-five grams of mature seeds were ground in a Waring blender with 400 ml of 50 mM Tris-HCl (pH 6.8) and 0.3 M sucrose. The extract was filtered and centrifuged as described before. The final pH of the supernatant was 6.85–6.90. Tris buffers were chosen here since sharper bands were obtained when aliquots of the supernatant and floating layers were analysed by SDS-PAGE [29]. The floated oil body fraction was resuspended in 50 mM Tris-HCl (pH 6.8) and 6 M urea. After 20 min of incubation in an ice bucket, the floated oil body fraction was recovered by centrifugation. The washing was repeated once and followed by two more washings in 50 mM Tris-HCl (pH 6.8) and 0.5 M NaCl. The oil bodies were resuspended in a minimal volume of water to obtain a slurry. In some experiments, the oil bodies were extracted and purified following the procedure reported by Tzen et al. [16]. Fractions of 0.1 ml of the resuspended oil bodies were mixed with 1 ml of 100% methanol. The oil bodies were recovered by centrifugation for 5 min at 10 000 rpm in a microcentrifuge, and the excess methanol was evaporated under nitrogen.

A preparation of 25–35 mg of the above dried oil bodies or freeze-dried microsomal fractions was mixed with 1 ml of benzene, incubated for 5 min at room temperature and the mixture was centrifuged in a microcentrifuge for 5 min. The supernatant was carefully withdrawn using a glass syringe with a stainless steel needle. The procedure was repeated three more times. The pellet was dried under nitrogen flow, but we took no provision to ensure complete elimination of any tightly bound solvent molecules. Where indicated in the text, the benzene was substituted by acetone, diisobutyl ketone, diethyl ether, CCl₄, hexane, or benzene/acetone (1:1, v/v). For reconstitution experiments, the sample was kept dry at –20°C until use. For gel filtration experiments, the sample was used immediately.

2.6. Gel filtration using porous glass beads

The delipidated dry microsomal or oil body preparation was washed once more with diethyl ether, dried again under nitrogen flow, and suspended in

water/methanol/acetic acid (1:1:1, v/v) at a concentration of 2.5 mg/ml. The suspended sample was incubated for 24–48 h at –20°C and centrifuged for 15 min at 14 000 rpm in a microcentrifuge. In these suspensions, no pellet was observed for the oil body sample, but some insoluble pellet was evident with the microsomal sample. This latter pellet was discarded. A 200 µl sample of the supernatant was injected onto a 13 ml (2.6×630 mm) column of 700 Å porous glass beads (120/200 mesh, 729 Å real pore size). The column was eluted with the same solvent, and the absorbance at 280 nm was monitored. Aliquots from the fractions collected from the column were dried under vacuum at 30°C. When the proteins were radiolabelled, the radioactivity was determined by scintillation counting. DAGAT activity was assayed in selected fractions after reconstitution with 1,2-*rac*-diacylglycerol (DAG) and PC as described below.

2.7. Reconstitution of delipidated samples with DAG, PC and/or Tween 20, and DAGAT activity assay

A sample of 0.2 mg of the freeze-dried microsomes, the dried delipidated microsomes or the dried and delipidated oil body preparation was mixed with 0.2 ml of a benzene solution of DAG, alone or together with PC, or Tween 20. The concentrations of DAG, PC and Tween 20 were those required to give 0.3 mM, 15 µg/ml, and 0.02%, respectively, in the final DAGAT assay. The organic solvent was evaporated under nitrogen flow and the sample was resuspended in 0.15 ml of assay buffer. The resuspension was sonicated at 20 MHz for 30 s and the DAGAT activity was then evaluated essentially as described by Cao and Huang [3] with [¹⁴C]oleoyl-CoA (7 µCi/mmol), at a final concentration of 30 µM. For the preparation of the assay buffer a solution of 5 mM palmitic acid with or without 3.5 mM dipalmitoyl diacylglycerol in 100% benzene was placed in a plastic tube and the solvent was dried under nitrogen flow. The dried lipids were mixed with 1 ml Tris-HCl 0.1 M (pH 7.4), 84 mM sucrose, 2 mM MgCl₂, and 0.02% Tween 20. The assay buffer was sonicated at 20 MHz for 30 s–1 min until a clear solution was obtained; the final concentration of palmitic acid was 0.1 mM and, when present, dipalmitoyl DAG was 0.3 mM.

2.8. Preparation of radiolabelled microsomal proteins and radiolabelled diacylglycerol

A sample of 15–20 maize developing embryos was incubated in MES–NaOH 5 mM (pH 5.5) in the presence of 30 mM sucrose, 1 μ M abscisic acid, and 0.5 M sorbitol for 24 h, and then for another 12 h in a fresh medium with 10 μ Ci 2-[14 C]acetate added. At the end of the incubation, the embryos were washed with fresh medium containing 0.03 M sodium acetate. For the preparation of microsomal 14 C-proteins, the microsomal fraction was prepared as described by Pacheco-Moisés et al. [11]. For the preparation of [14 C]DAG, the lipids were extracted from the incubated embryos as described by Rodríguez-Sotres and Black [17], and the TAG was purified by applying the lipid fraction to preparative 2 mm TLC plates, that were developed with hexane/diethyl ether/acetic acid (80:20:1, v/v). One thin stripe of the plate was exposed to iodine vapours. The positions of the different lipid classes were identified with the use of standards run in the same plate. The TAG spot was scraped off the plate and the TAG was extracted from the silica with dry chloroform.

A sample of 1–2 mg of radiolabelled TAG was dissolved in 1 ml of diethyl ether and mixed with 4.0 ml of 0.1 M triethanolamine–HCl 0.1 M (pH 7.4), 20 mM CaCl₂, and 0.05 g of porcine pancreatic lipase (crude fraction from Sigma). The mixture was incubated in an orbital shaker at 60 rpm and 30°C. At various lengths of time, aliquots were withdrawn and the DAG produced was monitored by TLC.

The reaction was stopped by the addition of 10 ml chloroform/methanol (1:1, v/v) when the conversion

of TAG to DAG reached about 15%. The chloroform layer was retained and the DAG was purified by preparative TLC as described above.

The DAG molar content of the purified fraction was determined with the method described by Rodríguez-Sotres and Black [17], and the radioactivity was determined by liquid scintillation counting.

3. Results and discussion

3.1. DAGAT preparations had substantial amounts of endogenous DAG

When DAGAT activity in microsomal fractions from developing maize seeds was assayed with [14 C]oleoyl-CoA as the acyl donor, [14 C]TAG was produced irrespectively of whether dipalmitoyl diacylglycerol (in 0.02% Tween 20) was added as the acyl acceptor (Table 1). The level of incorporation of [14 C]oleate into TAG was similar regardless of the addition of DAG. These data indicate that TAG formation in the maize microsomes did not require the addition of an exogenous acyl acceptor. This poses two questions. (i) Was all the radioactivity from acyl-CoA incorporated into TAG the result of DAGAT activity? (ii) How much of the labelled TAG came from the emulsified DAG added to the assay? In addition, attempts to determine the response of DAGAT to different DAG species at various concentrations would not be meaningful, because exogenous DAG was not essential for the detection of DAGAT activity. Even if DAGAT used both sources of DAG, the endogenous concentration was high enough to sustain good rates of

Table 1
Activity of DAGAT in microsomal fraction and its solubilized preparations from developing maize embryos

Preparation	DAG ^a (mM)	Incubation time (min)	Radioassay ^b (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	Enzymatic assay ^b (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)
Maize	0.3	0	0.11 \pm 0.1	0.19 \pm 0.08
	0.3	5	52.20 \pm 4.8	53.10 \pm 8.3
	0.0	5	68.10 \pm 6.0	57.30 \pm 5.1
Solubilized	0.0	5	7.30 \pm 1.4	8.90 \pm 0.9

The release of free CoA was followed spectrophotometrically and the formation of [14 C]TAG was followed by liquid scintillation counting. The solubilized fractions were obtained as the supernatant from the sonication of the microsomes with 1% MEGA-8 and 150 mM NaCl, and centrifugation at 100 000 \times g for 1 h.

^a1,2-Dipalmitoyl DAG 0.3 mM was emulsified in the assay medium, which contained 0.02% Tween 20 in all cases.

^bThe results are the mean \pm S.E. of three different experiments performed in triplicate.

TAG formation during the assay time (5 min or less). In agreement with our results, a recent report [18] could not analyse the effect of added DAG in their system, because the activity was the same without the external source of DAG.

DAG has been reported to be the most abundant metabolite of the Kennedy pathway in the *Brassica napus* developing seeds [19], but it is not clear how much of it is present in the membrane fraction. Therefore, we extracted and analysed by TLC the lipids from the microsomal fraction. The results shown in Fig. 1 demonstrate that a substantial amount of DAG and some TAG were present in the microsomal fraction before and after MEGA-8 solubilization. Phospholipids were also detected in high levels and, therefore, the acyl acceptors for other acyltransferases could also be present.

Many acyltransferases are present in the microsomal fraction [3,11]. It is possible that a significant part of the [^{14}C]TAG recovered under the DAGAT assay conditions could be the result of a lysophosphatidate acyltransferase, a phosphatidate phosphatase and a transacylase [20] acting together. These enzymes could channel the labelled oleate first into the pools of DAG or other lipid intermediates, and finally into TAG. In this case, the CoA released would be higher than the TAG produced; however, the stoichiometry of [^{14}C]TAG formed to CoA released during the assay was close to one (Table 1). The monoacylglycerol that could be expected from the transacylation was very low in microsomal fractions (Fig. 1). Although we were able to identify other labelled neutral lipids generated in the DAGAT assay (not shown), the label in these lipids was low when compared to that in TAG. Accordingly, the transacylase activity reported in safflower was found to be very low [20]. TAG can also be synthesized from phosphatidylcholine and DAG [21]; again, the 1:1 stoichiometry found in Table 1 suggests that this activity was low or absent in our preparations.

In an attempt to remove the DAG present in microsomal preparations from the developing embryos, we first reproduced the solubilization procedure reported by Little et al. [13]. The DAGAT activity recovered in the $100\,000\times g$ supernatant was assayed in the absence of exogenous DAG. A significant amount of [^{14}C]TAG was formed (Table 1). Fig. 1

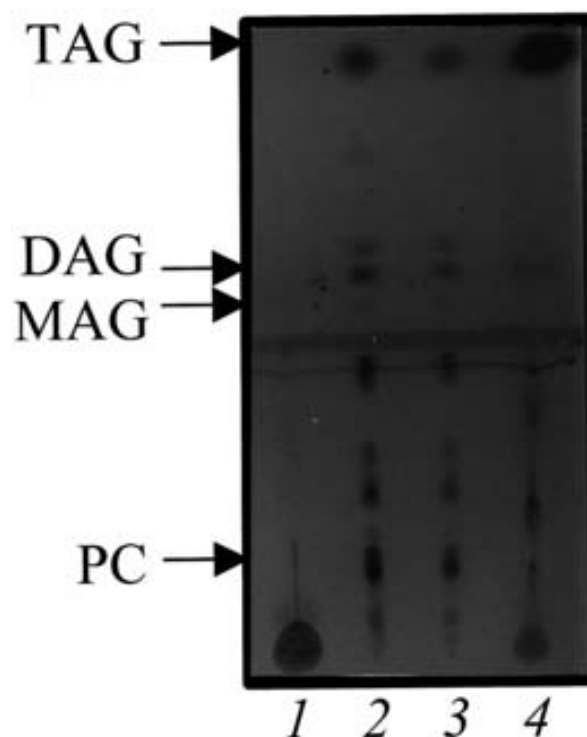


Fig. 1. TLC of lipids extracted from developing maize embryos (lane 2, equivalent to 107 μg of fresh embryos) or the microsomal fractions, before (lane 3, equivalent to 25 mg of fresh embryos) and after solubilization with MEGA-8 (lane 4, equivalent to 50 mg of fresh embryos, containing 0.3 μg of MEGA-8). The plate was developed with chloroform/methanol/acetic acid/water (170:30:20:7, v/v) up to the first half, and with hexane/diethyl ether/acetic acid (80:20:1, v/v) almost to the upper edge of the plate. Lipids were visualized with iodine vapours. Lane 1 is pure MEGA-8 (0.5 μg). The positions of known standards TAG (triacylglycerol), DAG (diacylglycerol), MAG (monoacylglycerol) and PC (phosphatidylcholine) are indicated.

shows that DAG and TAG were present in the above supernatant fraction. The MEGA-8 used in the solubilization procedure showed very little mobility on the TLC system and did not interfere with the identification of the neutral lipids. It is worthy of note that the solubilization of both polar and neutral lipids from the microsomal fraction by MEGA-8 was highly biased and the ratio TAG/DAG was increased. To visualize the DAG spot on the TLC plate, we had to apply a larger sample to the lane. We assayed the DAGAT activity in the microsomal fractions from other sources, and the solubilized preparations from the microsomes of developing wheat and pea embryos, and rat adipose tissue had detectable levels of activity in the absence of added

DAG (Table 2). However, in these cases the addition of exogenous DAG drastically increased the level of activity. These results suggest that the microsomal fractions from many systems contained significant amounts of DAG and much of this endogenous DAG was not removed by solubilization with MEGA-8. The preferential use of endogenous substrates *in vitro* has been observed with acyl-CoA: cholesterol acyltransferase [22], but in this last case the incorporation of exogenously added cholesterol was only slightly smaller than that of the endogenous one.

In an alternative procedure to remove DAG from the microsomes, the isolated frozen embryos were treated with cold acetone and the activity of DAGAT was assayed in the microsomes prepared from the acetone-washed tissue. In these experiments, the recovery of DAGAT activity was highly variable and when detected, the sample still contained DAG, as revealed by TLC analysis (not shown).

3.2. DAGAT had limited access to DAG emulsified with Tween 20 in the assay

As the first approach to evaluate the access of DAGAT to exogenous DAG, we allowed DAG emulsified with Tween 20 to bind to Immobilon membranes. When DAGAT was assayed with [¹⁴C]oleoyl CoA as the acyl donor, in a droplet of assay mixture deposited over the DAG-treated Immobilon membrane, we failed to detect a consistent radioactive signal of synthesized TAG above the background in the paper (not shown). Besides, even though we washed the paper extensively, the background radioactivity levels presented great variations.

Therefore, we used labelled DAG as the acceptor to determine if the DAG added as Tween 20 emulsion was used. We prepared 1,2-*rac*-[¹⁴C]diacylglycerol as described in Section 2. When maize microsomes were assayed with [¹⁴C]DAG (in 0.02% Tween) as the acceptor and unlabelled oleoyl-CoA as the donor, no labelled TAG was recovered (Table 3). Increasing the Tween concentration or addition of bovine serum albumin had little effect on these results (not shown).

From this last piece of evidence it can be concluded that DAGAT in the maize microsomal frac-

tion had very limited access to the DAG that was added as mixed micelles with Tween 20, at least under the our assay conditions. However, Table 2 shows that the MEGA-8-solubilized DAGAT was significantly more active after the addition of emulsified DAG. The specific activity of the maize solubilized preparation assayed in the presence of emulsified DAG was only slightly higher than that in the crude maize microsomes (Tables 1 and 2). When the solubilized fraction from maize microsomes was assayed with labelled DAG as an emulsion and unlabelled oleoyl-CoA the activity was between 5 and 50% of that found with labelled oleoyl-CoA and unlabelled DAG (not shown), but the label recovered in the product showed large variations between repetitions. Therefore, the results in Table 2 may be explained only partly by an increase in the DAGAT access to DAG, but additional physicochemical phenomena might be involved, like for instance the alteration of membrane vesicles derived from different membrane microdomains [23]. A more detailed investigation of this aspect would be required to answer these questions and is beyond the scope of this paper.

3.3. DAG was accessible to DAGAT when added in benzene

The fact that the way in which DAG was included

Table 2

Activity of DAGAT determined by spectrophotometric CoA assay in the MEGA-8 solubilized membrane fractions from various tissues

Tissue	DAGAT activity ^a (nmol CoA min ⁻¹ (mg protein) ⁻¹)	
	with DAG	without DAG
Developing maize embryos	65.6	2.59
Developing wheat embryos	85.4	2.12
Developing pea cotyledons	24.1	1.01
Rat liver	1.7	0.01
Rat adipose tissue	56.4	1.80

The experiment was repeated three times in duplicate; data are representative of one experiment since the activities in different preparations were variable amongst experiments.

^aThe lowest detectable activity considering the method sensitivity, the assay final volume and the amount of protein employed for these experiments was grossly 0.01 (nmol min⁻¹ (mg protein)⁻¹).

in the assay is important to the detection of the activity of DAGAT has been recognized since the enzyme was first discovered in animal tissues [2]. Vogel and Browse [24] reported a procedure in which freeze-dried microsomal fractions from developing oilseed rape were mixed with a benzene solution of either dipalmitoyl diacylglycerol or 1,2-*rac*-[¹⁴C]DAG; the solvent was evaporated, and the microsomes were suspended in an aqueous buffer at pH 7.4. We used this procedure to test if DAGAT was able to produce [¹⁴C]TAG when given 1,2-*rac*-[¹⁴C]DAG and unlabelled oleoyl-CoA, and if endogenous DAG could be removed by means of benzene washing. Table 3 shows that in untreated fresh microsomes the DAGAT activity was high when 1-[¹⁴C]oleoyl-CoA was present in the assay mixture, but undetectable when only unlabelled oleoyl-CoA was added together with labelled or unlabelled DAG in Tween emulsion. As expected, no radioactivity was incorporated if none of the substrates were labelled, and when both substrates were labelled the

radioactivity recovered was similar to that recovered with only the acyl donor labelled (Table 3). To calculate the activity, we assumed that the specific radioactivity of the DAG label was that of the substrate we added, and that both the acyl donor and the acceptor contributed to the label in the final product. However, this assumption underestimated the DAGAT activities with labelled DAG, because the labelled DAG could have been diluted by the endogenous DAG, and because when added in a Tween emulsion the labelled DAG made little or no contribution to the final label (Table 3). The data in Table 3 also indicate that DAGAT was not affected by the benzene treatment, but repeated washing of the freeze-dried microsomal fractions with benzene led to a complete loss of DAGAT activity in the assay, with or without the addition of Tween/DAG micelles.

We investigated if the DAGAT activity in the benzene-washed microsomal protein could be restored by the addition of pure DAG, alone or mixed with

Table 3
DAGAT activity in untreated, freeze-dried and benzene-washed microsomes from developing maize embryos

Microsomal preparation	Benzene washing (number)	Addition in benzene ^a	Assay condition ^b	DAGAT activity ^c (%)
Fresh	0	none	DAG+OCoA	0.7
	0	none	DAG+O*CoA	100
	0	none	DAG*+O*CoA	75
	0	none	O*CoA	88
	0	none	DAG*+OCoA	> 0.5
Freeze-dried	0	none	DAG+O*CoA	91
	0	DAG	O*CoA	53
	0	DAG*	OCoA	65
	0	DAG*+MEGA-8	OCoA	81
	1	none	DAG+O*CoA	47
	2	none	DAG+O*CoA	18
	3	none	DAG+O*CoA	2.5
	4	none	DAG+O*CoA	> 0.5

When indicated, the microsomes were freeze-dried and washed with benzene one or more times. The samples were dried by evaporation under nitrogen, resuspended and their DAGAT activities were assayed.

^aThe benzene solution was mixed with the freeze-dried microsomes, and the solvent was evaporated before the sample was resuspended in the assay medium. The DAG added was sufficient to give a final concentration of 0.3 mM in the assay. When added, MEGA-8 was 1% in the final assay.

^bThe basic assay medium contained 0.1 M Tris-HCl (pH 7.4), 0.084 M sucrose, 0.02% Tween 20, 2 mM MgCl₂ and 0.1 mM palmitic acid. When indicated, the medium also contained 0.3 mM dipalmitoyl diacylglycerol (DAG) or [¹⁴C]diacylglycerol (DAG*, 2.5 μCi/mmol), 20 mM oleoyl-CoA (OCoA) or 1-[¹⁴C]oleoyl-CoA (O*CoA, 70 μCi/mmol), and 200 μg of microsomal protein, in a final volume of 150 μl.

^cThe standard deviation of the routine assay was below 15%. The results are the mean of three experiments run in duplicate. The lowest detectable activity considering the assay final volume and the amount of protein employed for these experiments was grossly 0.5%. The activities below the detectable level are indicated as >0.5. Control activities were 235, 200, and 59 nmol min⁻¹ (mg protein)⁻¹ for the three repetitions, respectively.

Tween 20 or pure PC. Table 4 shows that the activity could be restored by the addition of 1,2-*rac*-[¹⁴C]diacylglycerol or 1,2-*sn*-dipalmitoyl glycerol, but only when added together with purified soybean lecithin. Addition of pure PC alone was not enough to restore the activity if the enzyme was assayed without DAG, and only a small fraction of the initial activity was detected with the DAG as an emulsion. DAG was also effective when added along with Tween 20 in benzene solution, indicating that the effect of PC was more likely due to the structure of the DAG in the lipid phase than with a specific activation of the DAGAT by this lipid. The rate of formation of [¹⁴C]TAG was similar with either [¹⁴C]oleoyl-CoA as the donor or with [¹⁴C]DAG as the acceptor. Finally, addition of DAG in Tween 20 micelles to the assay had only a small effect on the formation of [¹⁴C]TAG either with [¹⁴C]oleoyl-CoA

as the donor or with [¹⁴C]DAG as the acceptor, but some incorporation was observed when only Tween 20 in benzene was added to the washed microsomal protein, followed by drying, resuspension and assay (Table 4). This last result suggests that the DAG micelles in the assay were not accessible to the DAGAT because the enzyme was somehow trapped in a phase that was not completely exposed to the solvent. So the effect of Tween 20 could be the disruption of the interphase, thus allowing a mass transfer between Tween 20/DAG micelles and the membrane-protein phase.

3.4. DAGAT is present in oil bodies from both immature and mature maize embryos

Oil bodies from freshly excised maize developing embryos were purified and thoroughly washed with

Table 4
DAGAT activity in benzene-washed maize microsomal fractions

Addition				To the assay			DAGAT activity ^c (nmol min ⁻¹ (mg protein) ⁻¹)
As benzene solution				DAG ^b	O-CoA ^b	*O-CoA ^b	
DAG ^a	*DAG ^a	PC ^a	Tween ^a				
+	–	–	–	+	+	+	5
+	–	–	–	–	+	+	2
–	–	+	–	+	+	+	12
–	–	+	–	–	+	+	4
–	–	–	+	+	+	+	1.3
–	–	–	+	–	+	+	1
+	–	+	–	+	+	+	191
+	–	+	–	–	+	+	149
–	+	+	–	–	–	–	>0.5
–	+	+	–	+	+	–	172
–	+	+	–	–	+	–	159
–	+	+	–	–	+	+	200
+	–	–	+	–	+	+	133
–	+	–	+	–	+	–	118

The microsomal sample was freeze-dried, and washed four times with benzene. When indicated, the washed samples were reconstituted with a benzene solution of dipalmitoyl diacylglycerol alone or in the presence of Tween 20 or phosphatidylcholine. Then, the solvent was evaporated, and the dried samples were resuspended and assayed for DAGAT activity.

^aAdded to the dried delipidated proteins as a benzene solution. The presence of ¹⁴C label in the compound is indicated with an asterisk. The amount added was sufficient to give a final concentration in the assay of 0.3 mM DAG with or without 1-[¹⁴C]DAG (0.05 μCi), 15 μg/ml PC, 0.02% Tween 20, alone or in the indicated combinations.

^bThe basic assay medium contained 0.1 M Tris-HCl (pH 7.4), 0.084 M sucrose, 0.02% Tween 20, 2 mM MgCl₂, and 0.1 mM palmitic acid. When indicated, 0.4 mM dipalmitoyl diacylglycerol, 20 μM oleoyl-CoA with or without 1-[¹⁴C]oleoyl-CoA (0.2 μCi) and 200 μg of microsomal protein, were added to a final volume of 150 μl. When DAG was added both to the dried sample and to the assay medium, the final DAG concentration was 0.7 mM.

^cThe standard deviation of the determinations was below 15%; the indicated results are the mean of three experiments run in duplicate. The lowest detectable activity considering the assay final volume and the amount of protein employed for these experiments was grossly 0.5 (nmol min⁻¹ (mg protein)⁻¹). The activities below the detectable level are indicated as >0.5.

benzene as described in Section 2. Further extraction of the dry powder with chloroform/methanol (1:1, v/v) rendered no detectable TAG, DAG or monoacylglycerol (MAG) and only little, if any, polar lipids (not shown). A sample of the protein was mixed with a benzene solution of 1,2-*sn*-dipalmitoyl diacylglycerol, PC, and Tween 20. The benzene was evaporated and the sample was resuspended in assay buffer (the final concentrations were 0.3 mM DAG, 15 mg/ml PC and 0.02% Tween 20). Then, the DAGAT activity was assayed in the standard assay. We did not detect DAGAT activity in the oil body fraction of maize immature embryos before delipidation and reconstitution, but when the sample had been delipidated we detected a very low activity ($1 \pm 0.2 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$). When the delipidated fraction was reconstituted with DAG, PC and Tween 20, the activity rose more than 10 times ($11.9 \pm 0.1 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$), which represents 29% of the activity present in the microsomal fraction recovered from the same lot of embryos ($41.8 \pm 0.5 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$) and almost the same as found in the microsomal protein after delipidation and reconstitution ($14.8 \pm 0.5 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$). The activity found in this fraction is too high to be completely ascribed to microsomal contamination that could be present in this preparation of oil bodies. In addition, contrary to the activity loss observed after the delipidation and reconstitution of the microsomal proteins, we recovered much more activity in the oil body fraction after a similar treatment. Our results are consistent with DAGAT being present in the oil body fraction, and are in agreement with a recent report of the presence of high DAGAT activity in the low density membrane fractions of extracts from developing rapeseed [25], and with the presence of DAGAT activity in the oil bodies of an oleaginous fungi [7]. Apparently, the fact that fully formed oil bodies contain almost no endogenous DAG has precluded detection of this enzyme in this organelle.

Oil bodies from mature embryos were also purified, delipidated with benzene and dried. We then assayed the solubility of protein in the lipid-free oil body fraction in organic solvents. The protein was insoluble in pure methanol, dimethyl sulphoxide, chloroform or diethyl ether. It was also insoluble in mixtures of methanol/water (1:1, v/v) with 1% tri-

fluoroacetic acid. However, we were able to prepare a clear suspension at 5 mg/ml in water/methanol/acetic acid (1:1:1, v/v). The resulting suspension was clear, was only slightly more viscous than the solvent itself, and after 24 h of incubation at -20°C (above its freezing point), the proteins could not be separated by centrifugation for 1 h at $5000 \times g$. A sample of the protein was kept at -20°C for 1 week; the solvent was evaporated under vacuum, and the protein supplemented with DAG and PC in benzene as described before. The DAGAT activity present in this oil body protein fraction was still between 50 and 60% of that present in the original oil body fraction that was reconstituted with DAG and PC and resuspended immediately after delipidation (not shown), i.e. the DAGAT was retained after a 1 week treatment with 33% methanol and 33% acetic acid. This result suggests that, at least in some cases, the inability to detect the DAGAT activity in the oil body fraction after solubilization with strong detergents was more related to the limitations of including DAG in a form that could be used by the enzyme in the assay medium, than to the irreversible loss of the biological functionality of the DAGAT protein.

A sample of 5 mg of lipid-free microsomal protein from maize embryos (either mature or immature) could also be suspended in 1 ml methanol/water/acetic acid (1:1:1, v/v), although some proteins remained insoluble even after 24 h incubation and were eliminated by centrifugation for 15 min at $5000 \times g$. The resulting suspension was again clear and appeared closer to a true solution than the one obtained with the oil body proteins. A substantial DAGAT activity could also be detected in these proteins when they were dried under vacuum, reconstituted with DAG and PC and assayed (Table 5).

3.5. DAGAT was purified in a small quantity by gel filtration

When a 0.2 ml sample of the oil body protein suspension in methanol/acetic acid/water (1:1:1, v/v) was applied to a column of porous glass beads (700 Å) and eluted with the same solvent mixture, most of the proteins were eluted as a single peak at the void volume (above the theoretical exclusion size of 30 000 kDa, see Fig. 2A). This result suggests that the proteins were not present as a true solution of

individual molecules, but rather as a suspension of high molecular mass aggregates. Although the UV-visible absorbance spectrum of the void volume proteins showed a broad peak with a maximum at 284 nm (not shown), it could represent those of the proteins or the benzene left over after the washings used for the removal of lipids. Nevertheless, the benzene would be bound to the proteins, as judged from the apparent molecular size of the proteins in the peak. The remainder of the elution profile showed only a few minor peaks of UV absorbance, but when the fractions representing these minor peaks were dried and reconstituted with DAG and PC, a single peak of DAGAT activity at fractions 63–67 was observed. The activity recovered in these fractions was higher than that in the sample before its application to the column (Table 5). We estimated the molecular mass of the DAGAT protein to be 100 kDa by running protein standards in sodium phosphate buffer 0.15 M (pH 7.2), and assuming that the column and the solvent did not alter the molecular masses of the protein. Standard assay methods for protein as performed by Bradford [26] and Lowry [27] and with bicinchoninic acid [28] were not sensitive enough to allow determination of the protein amount in the DAGAT fraction. It is possible that the absorbance detected in the DAGAT was due to some benzene bound to the proteins, or that DAGAT and other proteins in the sample have an unusual high UV absorbance, but react poorly with standard protein reagents. In addition, when the whole DAGAT peak fractions from one injection onto the column was applied to SDS-PAGE and the gel was subjected

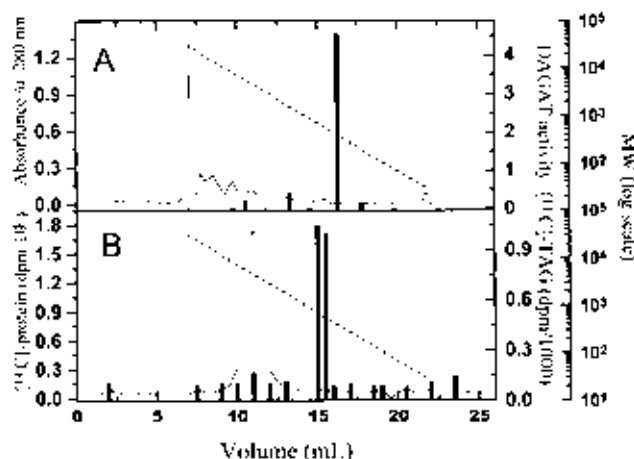


Fig. 2. Elution of oil body (A) and microsomal (B) proteins from a porous glass 700 Å column in methanol/acetic acid/water (1:1:1, v/v). The elution profile of the oil body proteins was followed by absorbance at 280 nm. The microsomal ^{14}C -proteins were labelled by feeding immature maize embryos with [^{14}C]acetate for 12 h. The microsomal protein was delipidated, resuspended in the above solvent mixture and applied to the column. Aliquots of the eluted fractions were counted by liquid scintillation. DAGAT activity (grey bars) with [^{14}C]oleoyl-CoA as acyl donor was determined in selected fractions after evaporation and reconstitution with DAG and PC in benzene. The dotted straight line indicates the approximate molecular mass elution profile assuming a linear relationship between the Stokes radii of the proteins and the elution volume.

to silver staining, no protein bands were visible. These results indicate that the assay is very sensitive, or DAGAT has a high k_{cat} , and that it was eluted from the column with only a small amount of other proteins. However, we are aware of the fact that more than one isozyme of DAGAT could be in the

Table 5
DAGAT purification in glass porous beads

Step	Total protein (mg)	Total activity (nmol min ⁻¹)	Specific activity (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹) ^a	Yield (%)
Crude extract	74.5	817	11	100
Microsomes	1.87	215	115	26.3
Delipidation and solubilization	0.06	2.8	47	0.3
Glass porous beads	below 0.005	7	unk.	0.9
Oil bodies	2	unk.	below 1	
Delipidation and solubilization	1	119	119	100
Glass porous beads	below 0.005	506	unk.	425

A crude extract from developing maize embryos was used to yield microsomes, which were then delipidated and resuspended in methanol/acetic acid/water (1:1:1, v/v). A 200 µl sample was injected onto a 13 ml porous glass bead column. Protein was quantitated with the bicinchoninic protein assay. DAGAT activity was assayed as described by a radio procedure.

^aIn the steps following delipidation, the protein was reconstituted with DAG and PC in benzene solution before resuspension and assay.

preparation, since previous reports have indicated that a DAGAT could be present in pea root plastids [29].

In order to detect the protein in the DAGAT peak fraction, we isolated 10 developing maize embryos and incubated them in the presence of abscisic acid (ABA), a high osmoticum (mannitol) and 2- ^{14}C acetate (10 μCi) for 12 h [11]. The lipid-free microsomal and oil body fraction were then obtained. Since the amount of radioactivity incorporated in the microsomal protein was substantially higher than that in the oil body fraction, we fractionated the microsomal proteins in the porous glass column using the solvent mixture mentioned above. We eluted the radioactive material from the column and assayed the radioactivity by liquid scintillation and the enzyme activity. Fig. 2B shows that a single DAGAT of activity peak was found, with almost the same elution volume as the one found before (Fig. 2A) and it coincided with one of the smallest peaks of radioactivity. The result indicates that DAGAT is of low abundance, and it was very poorly labelled. As before, the total activity recovered in the peak fraction was higher than in the sample applied to the column, and the overall yield from the crude extract was low (Table 5). Although poor label may be due to a number of factors, we found that the incorporation of ^{14}C acetate into proteins was 10–15% of the total uptake in only the first 4 h of incubation of the embryos, under otherwise identical conditions. The fact that the protein was so poorly labelled and its presence in the oil body fraction of maize dry seeds (not shown) may indicate a low turnover at this advanced stage of the development of the embryo. We failed to increase the label in the DAGAT peak even when the embryos were first incubated for 12 h in a medium containing no ABA or mannitol, and then transferred to a medium in the presence of ABA and 500 mM mannitol for 48 h, and in the presence of labelled acetate for the last 24 h. In a previous paper, these conditions resulted in a decrease in the activity of DAGAT in the microsomal fraction after the first 24 h, and then the activity level recovered gradually to almost the initial level, by the end of the incubation in the medium with ABA or mannitol [11]. This last observation suggests that the activity recovery induced by the low osmotic potential and ABA may not require the expression of the

DAGAT. Clearly, further research is required to clarify this point.

3.6. DAGAT could be treated with various organic solvents without complete loss of activity

Because we were interested in finding better solubilization and purification schemes, we investigated which organic solvents could be used to treat the microsomal freeze-dried proteins to eliminate the endogenous DAG without losing enzyme activity. For this experiment, protein samples obtained from 1 vol. of a microsomal suspension were freeze-dried and washed four times with 4 vols. of a different organic solvent. A solution of DAG and PC was added to the dried proteins in the same solvent used for the washings and the solvent was evaporated under nitrogen flow; the dried proteins were resuspended in an aqueous buffer and assayed by the standard DAGAT assay. The lipids extracted from each one of the four washings were recovered, concentrated under vacuum and separated by TLC. Fig. 3 shows that all solvents employed were able to extract a significant amount of lipids from the microsomal proteins (Fig. 3A–H), and that some activity was still detected in the resuspended and reconstituted protein, except for the diisobutyl ketone washings (Fig. 3B). The activity recovered from the acetone-washed protein was as high as that in the unwashed freeze-dried sample. We did not find any differences in the lipid classes extracted by the solvents employed that could be correlated with the level of activity detected. However, the fact that acetone, well known for its ability to extract neutral lipids better than polar lipids, allowed the highest recovery of activity may indicate that DAGAT was activated by some polar lipids other than PC. On the other hand, it is possible that stronger solvents were able to extract more DAGAT protein from the sample. In fact, if the microsomal freeze-dried proteins were washed more than four times with benzene, the benzene recovered from the fifth and sixth washing still extracted a small amount of an oily residue after evaporation. When this residue was dried and re-extracted with diethyl ether, there was an ether insoluble material that could be resuspended in SDS-PAGE sample buffer [15], separated and silver stained; some low molecular mass protein bands were detected (not

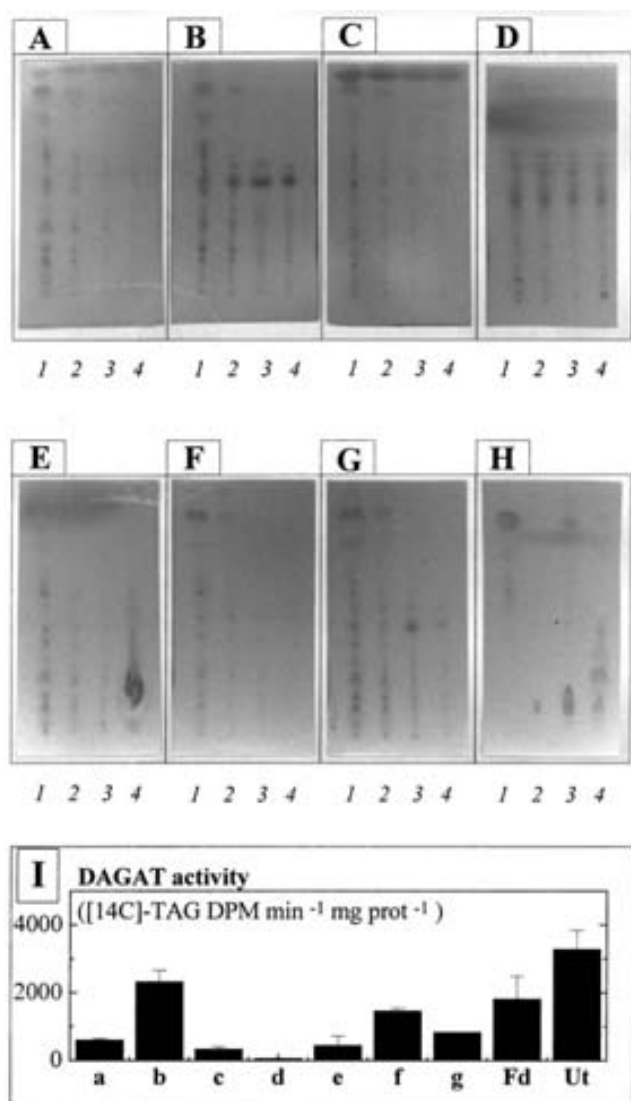


Fig. 3. Lipid extraction and DAGAT activity in freeze-dried microsomal fractions of developing maize embryos. The microsomal fractions were prepared, freeze-dried and extracted four times with the indicated organic solvent. The lipids recovered on each wash were concentrated under nitrogen flow, and separated by TLC as in Fig. 1. In panels A–G, lanes 1–4 are the lipids extracted with each successive wash. For comparison, in panel H are the lipids in olive oil (lane 1), pure phosphatidylcholine (lane 2), lecithin from Sigma (lane 3), and egg yolk polar lipid fraction (lane 4). Panel I shows the DAGAT activity recovered after four extractions, and reconstitution with DAG and PC. DAGAT was assayed with 1-¹⁴C]oleoyl-CoA as acyl donor and no emulsified DAG. The activities in the freeze-dried microsomes (Fd) and in the original microsomal preparation (Ut) are also shown. The solvents employed were benzene (A, Ia), acetone (B, Ib), diethyl ether (C, Ic), diisobutyl ketone (D, Id) carbon tetrachloride (E, Ie), hexane (F, If), and benzene/acetone (1:1, v/v) (G, Ig).

shown). We did not attempt to use a more quantitative approach in the organic solvent extraction experiments. The existence in the solvent extracts of essential or non-essential activators of the enzyme, the DAGAT solubility in the solvents employed, or other factors that could explain the observed loss of activity can be better investigated once a pure enzyme preparation is available in good yield.

The results in this paper indicate that DAGAT is stable in the presence of organic solvents and that the detection of its activity is very much dependent of the way in which the acyl acceptor is included in the assay. In addition, the results are consistent with this enzyme being present in both the microsomal membrane and the oil body fractions, but at very low abundance. We are considering over-expression of the gene in a heterologous living system as an alternative source of the enzyme for future studies.

Acknowledgements

The author would like to express special thanks to Prof. Antony Huang for his invaluable advice and the critical review of the manuscript and to Carlos Mújica for his technical help. This work was funded by grants CONACYT/1007PN, DGAPA-UNAM/IN244098, and PAIP-FQ-UNAM/6290-09.

References

- [1] M.R. Bell, R.A. Coleman, in: P. Boyer (Ed.), *Enzymes of Triacylglycerol Formation in Mammals*, Academic Press, New York, 1983, pp. 87–111.
- [2] S.B. Weiss, E.P. Kennedy, J.Y. Kiyatzu, The enzymatic synthesis of triglycerides, *J. Biol. Chem.* 235 (1960) 40–44.
- [3] Y.Z. Cao, A.H.C. Huang, Diacylglycerol acyltransferase in maturing oil seeds of maize and other species, *Plant Physiol.* 82 (1986) 813–820.
- [4] E.R. Olukoshi, N.M. Packter, Isolation of triacylglycerol synthase activity from *Streptomyces lividans*, *Biochem. Soc. Trans.* 20 (1992) 99S.
- [5] H. Nakagawa, Y. Kashiwabara, Metabolism of triacylglycerol in *Mycobacterium smegmatis*, *J. Biochem.* 80 (1976) 923–928.
- [6] T. Akao, T. Kasaka, Solubilization of diacylglycerol acyltransferase from the membrane of *Mycobacterium smegmatis*, *J. Biochem.* 80 (1976) 723–728.
- [7] Y. Kamisaka, T. Nakahara, Characterization of the diacyl-

- glycerol acyltransferase activity in the lipid body fraction from an oleaginous fungus, *J. Biochem.* 116 (1994) 1295–1301.
- [8] Y.Z. Cao, A.H.C. Huang, Acyl coenzyme A preference of diacylglycerol acyltransferase from the maturing seeds of *Cuphea*, maize, rapeseed, and canola, *Plant Physiol.* 84 (1987) 762–765.
- [9] S. Cases, S.J. Smith, Y.W. Zheng, H.M. Myers, S.R. Lear, E. Sande, S. Novak, C. Collins, C.B. Welch, A.J. Lusis, S.K. Erickson, R.V. Farese Jr., Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 13018–13023.
- [10] D.H. Hobbs, Ch. Lu, M.J. Hills, Cloning of a cDNA encoding diacylglycerol acyltransferase from *Arabidopsis thaliana* and its functional expression, *FEBS Lett.* 452 (1999) 145–149.
- [11] F. Pacheco-Moisés, L. Valencia-Turcotte, M. Altúzar-Martínez, R. Rodríguez-Sotres, Regulation of acyltransferase activity in immature maize embryos by abscisic acid and the osmotic environment, *Plant Physiol.* 114 (1997) 1095–1101.
- [12] L. Valencia-Turcotte, R. Rodríguez-Sotres, in: J. Sánchez, E. Cerdá-Olmedo, E. Martínez-Force (Eds.), *New Advances in Plant Lipids Research*, Universidad de Sevilla, Sevilla, 1998, pp. 184–186.
- [13] D. Little, R. Weselake, K. Pomeroy, S.T. Furukawa, J. Bagu, Solubilization and characterization of diacylglycerol acyltransferase from microspore derived cultures of oilseed rape, *Biochem. J.* 304 (1994) 951–958.
- [14] J.T.C. Tzen, Y.Z. Cao, P. Laurent, C. Ratnayake, A.C.H. Huang, Lipids, proteins and structure of seed oil bodies from diverse species, *Plant Physiol.* 101 (1993) 267–276.
- [15] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [16] J.T.C. Tzen, P. Chi-Chung, Ch. Dor-Jih, E.C.F. Chen, J.M.H. Chiu, A new method for seed oil body purification and examination of oil body integrity following germination, *J. Biochem.* 121 (1997) 762–768.
- [17] R. Rodríguez-Sotres, M. Black, Osmotic potential and abscisic acid regulate triacylglycerol synthesis in developing wheat embryos, *Planta* 192 (1994) 9–15.
- [18] R.J. Weselake, E.C. Kazala, K. Cianflone, D.D. Boehr, C.K. Middleton, C.D. Rennie, A. Laroche, I. Renick, Human acylation stimulating protein enhances triacylglycerol biosynthesis in plant microsomes, *FEBS Lett.* 481 (2000) 189–192.
- [19] H.J. Perry, J.L. Harwood, Changes in the lipid content of developing seeds of *Brassica napus*, *Phytochemistry* 32 (1993) 1411–1415.
- [20] K. Stobart, M. Mancha, M. Lenman, A. Dahlqvist, S. Stymne, Triacylglycerols are synthesised and utilized by transacylation reactions in microsomal preparations of developing safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seeds, *Planta* 203 (1997) 58–66.
- [21] A. Dahlqvist, U. Ståhl, M. Lenman, A. Banas, M. Lee, L. Sandager, H. Ronne, S. Stymne, Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase: an enzyme that catalyzes the acyl-CoA independent formation of triacylglycerol in yeast and plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000) 6487–6492.
- [22] M.L. Smith, L.J. Madden, J. de Jersey, Effect of exogenous cholesterol and dithiothreitol on the activity of acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase, *Clin. Chim. Acta* 256 (1996) 13–25.
- [23] M.G. Waugh, D. Lawson, S.K. Tan, J.J. Hsuan, Phosphatidylinositol 4-phosphate synthesis in immunisolated caveola-like vesicles and low buoyant density non-caveolar membranes, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 17115–17121.
- [24] G. Vogel, J. Browse, Cholinephosphotransferase and diacylglycerol acyltransferase. Substrate specificities at a key branch point in lipid metabolism, *Plant Physiol.* 110 (1996) 923–931.
- [25] D.J. Lacey, M.J. Hills, Purification of a low density membrane fraction from developing seeds of *Brassica napus*, *Phytochemistry* 50 (1999) 915–917.
- [26] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–274.
- [27] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [28] K.P. Smith, H.I. Krohn, T.G. Hermanson, G.H. Mallia, D.M. Provenzano, K.E. Fujimoto, M.N. Goeke, J.B. Olson, C.D. Klenk, Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.* 150 (1985) 76–85.
- [29] L. Xue, L.M. McCune, K.F. Kleppinger-Sparace, M.J. Brown, M.K. Pomeroy, S.A. Sparace, Characterization of the glycerolipid composition of pea root plastids, *Plant Physiol.* 113 (1997) 549–557.