

In vivo knock-down of *Gpat2* activates apoptosis



Garcia-Fabiani MB, Stringa P, Cattaneo ER, Pellon-Maison M, Henning MF, Montanaro MA, Gonzalez-Baró MR.
Inst. de Invest. Bioquímicas de La Plata "Prof. Dr. RR Brenner" (INIBIOLP) - Fac. de Cs. Médicas, CONICET-UNLP.
E-mail: mbgarciafabiani@yahoo.com.ar



INTRODUCCIÓN

La síntesis *de novo* de los glicerolípidos comienza con la acilación del glicerol-3-fosfato. Esta reacción es limitante y está catalizada por la glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT). Existen 4 isoformas para esta enzima en mamíferos, GPAT 1-4, que difieren en su localización subcelular y tisular y su regulación (Fig. 1). GPAT2 posee un patrón de expresión único y característico en comparación con el resto de las isoformas, ya que se expresa exclusivamente en células espermáticas, a diferencia del resto que se expresan en tejidos involucrados en el metabolismo de lípidos. Su perfil de expresión durante la maduración testicular posnatal en ratón muestra un pico en la cantidad de ARNm a los 15 días y en el adulto su expresión es máxima en espermatozoides en paquitenio (Fig. 2).

Fig. 1

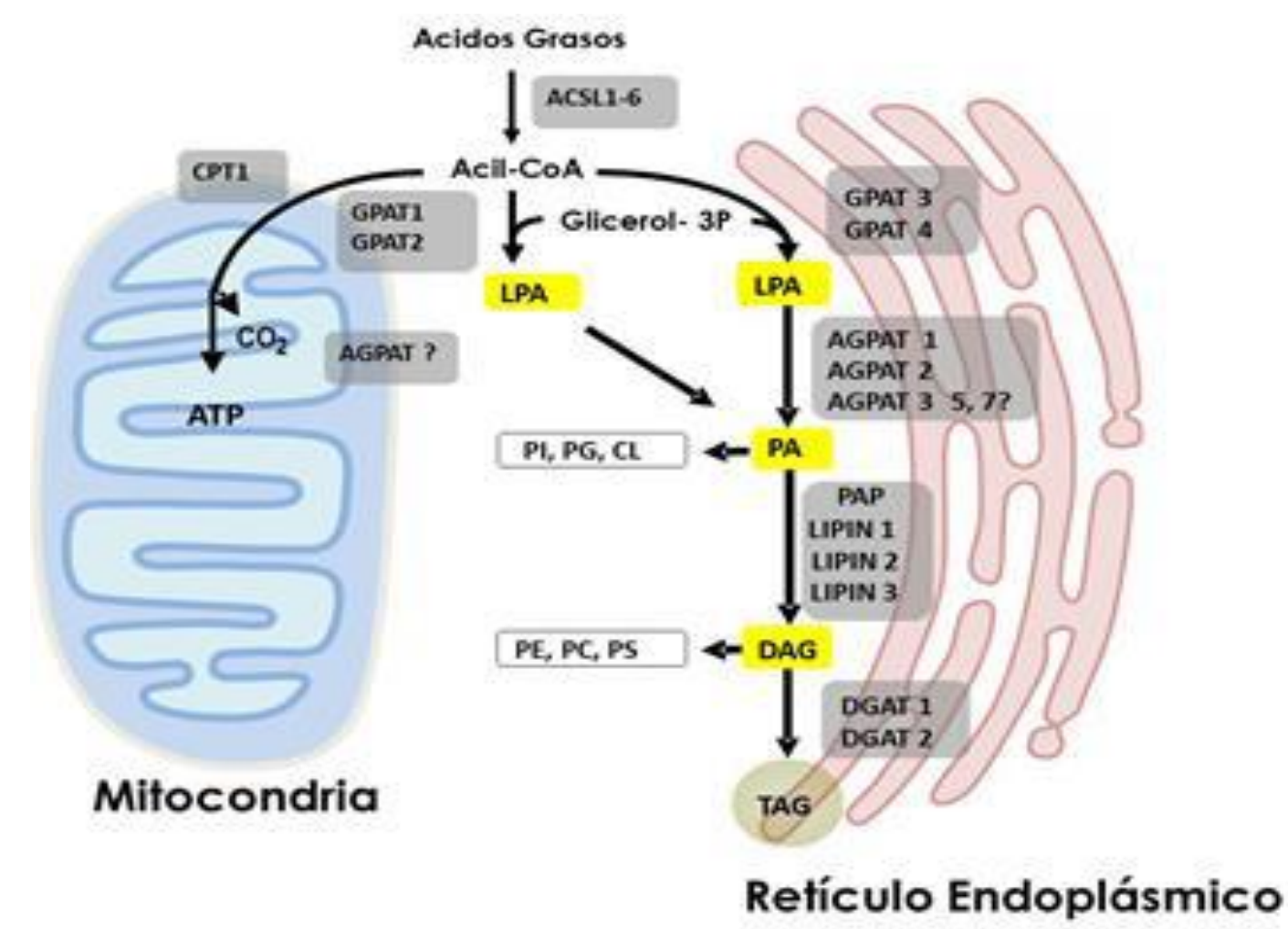
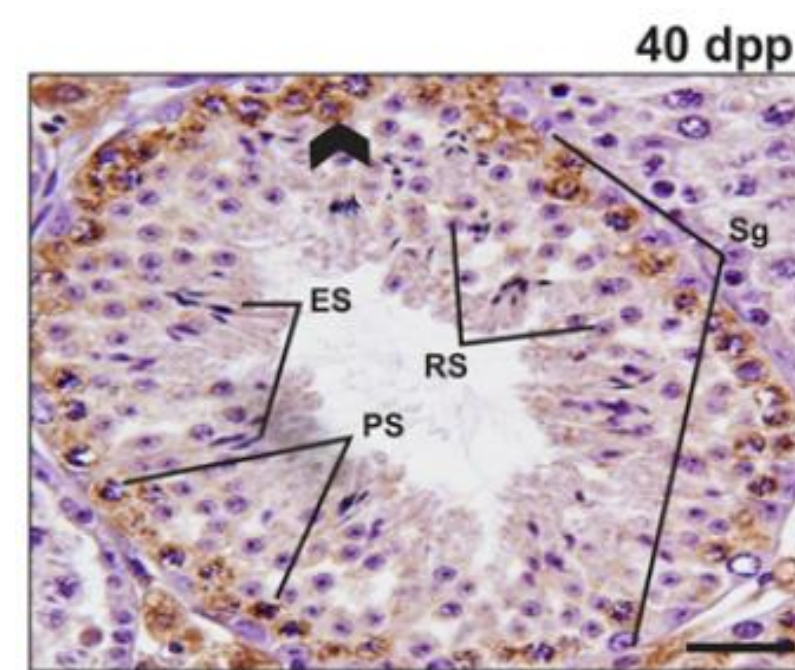


Fig. 2

IHQ para GPAT2 en testículo de ratón de 40 días de edad.



Se muestran células germinales en distintas etapas de la maduración espermática. Sg: espermatogonia, PS: espermatocito en paquitenio, RS: espermatide redonda, ES: espermatide elongada. Punta de flecha: células GPAT2 (+). Barra de escala: 50 μ m.

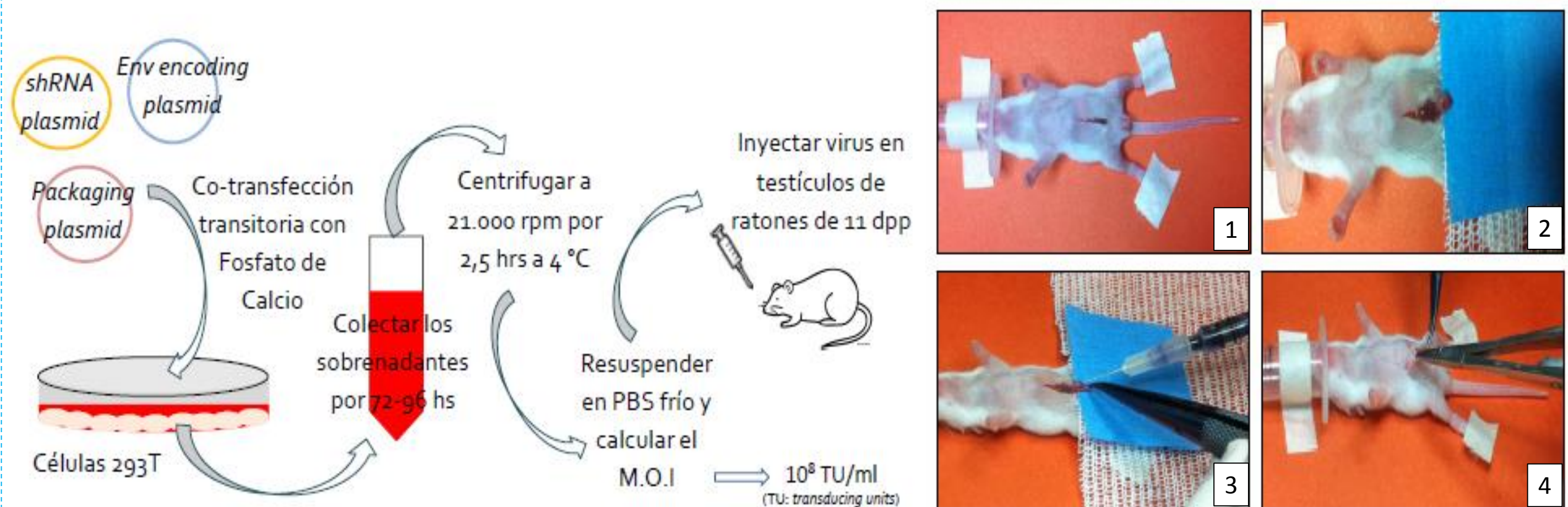
OBJETIVO

Para esclarecer cuál es la importancia de GPAT2 en testículo, hemos establecido en nuestro laboratorio un modelo de silenciamiento *in vivo* de *Gpat2* en ratón. En él observamos que la disminución de esta proteína causa: 1) arresto espermatogénico, 2) disminución en el número de células germinales y 3) defectos en la reproducción.

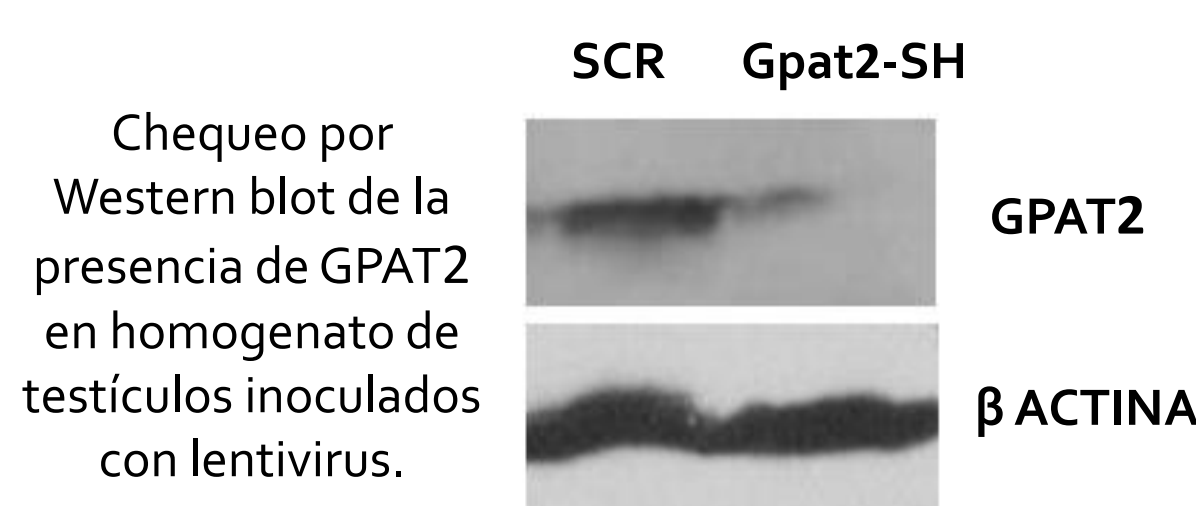
Por lo tanto, para determinar cuál es el mecanismo por el cual la ausencia de GPAT2 causa problemas en la espermatogénesis, medimos por qPCR la expresión de genes vinculados con las vías de apoptosis.

MÉTODOS Y RESULTADOS

Producción de lentivirus e inoculación intratesticular

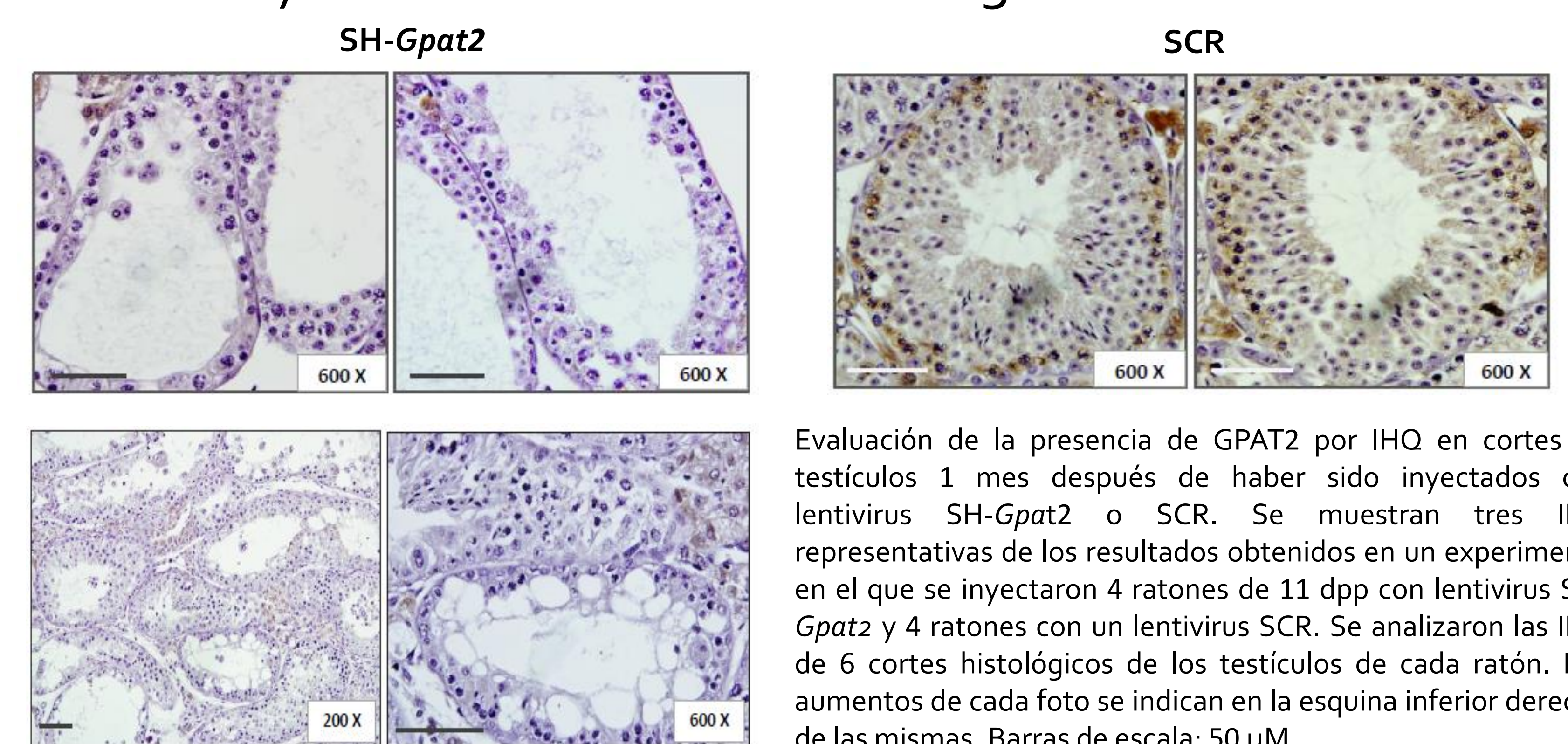


Dos tipos de lentivirus fueron producidos según este protocolo: uno para silenciar la expresión de *Gpat2* de ratón, que porta un shRNA específico contra su mRNA (*Gpat2*-SH), y otro cuya secuencia shRNA no silencia ningún gen en ratón (secuencia "scramble" o SCR).



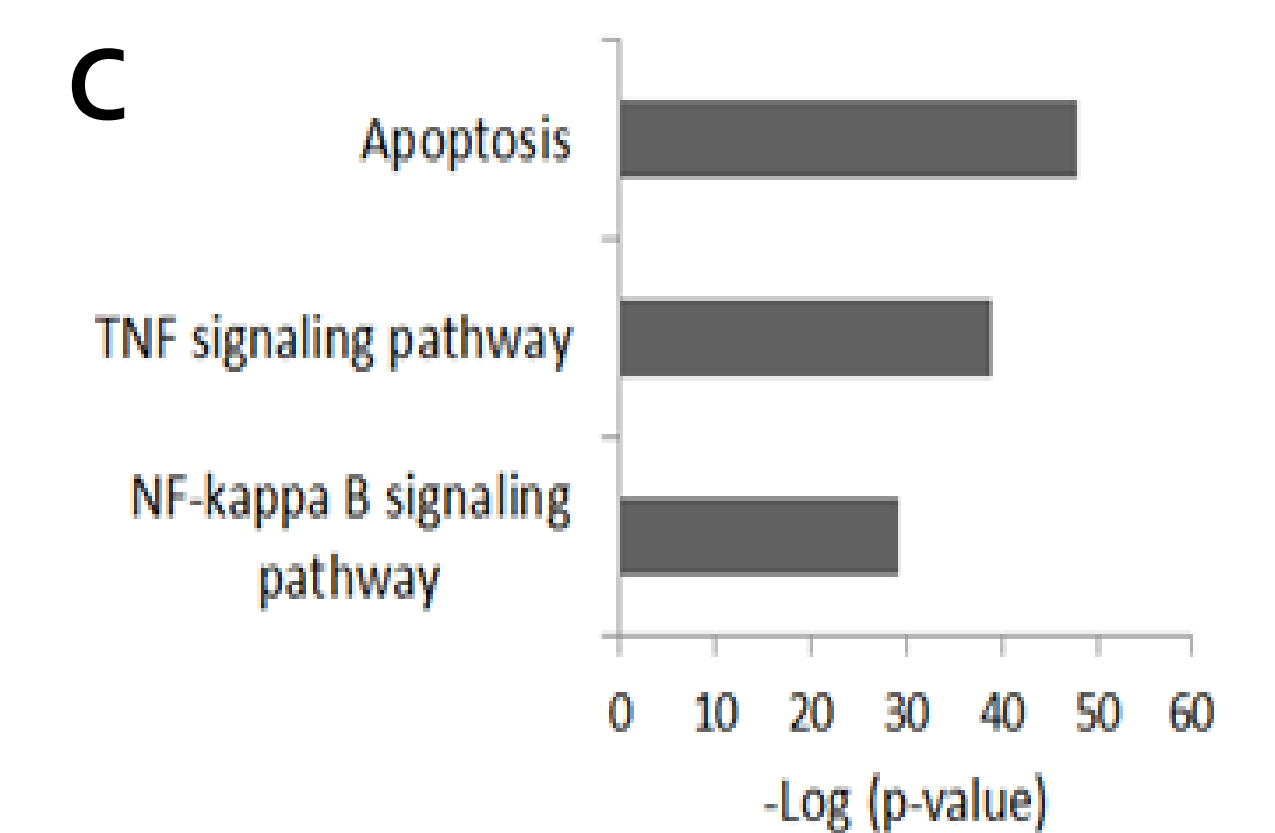
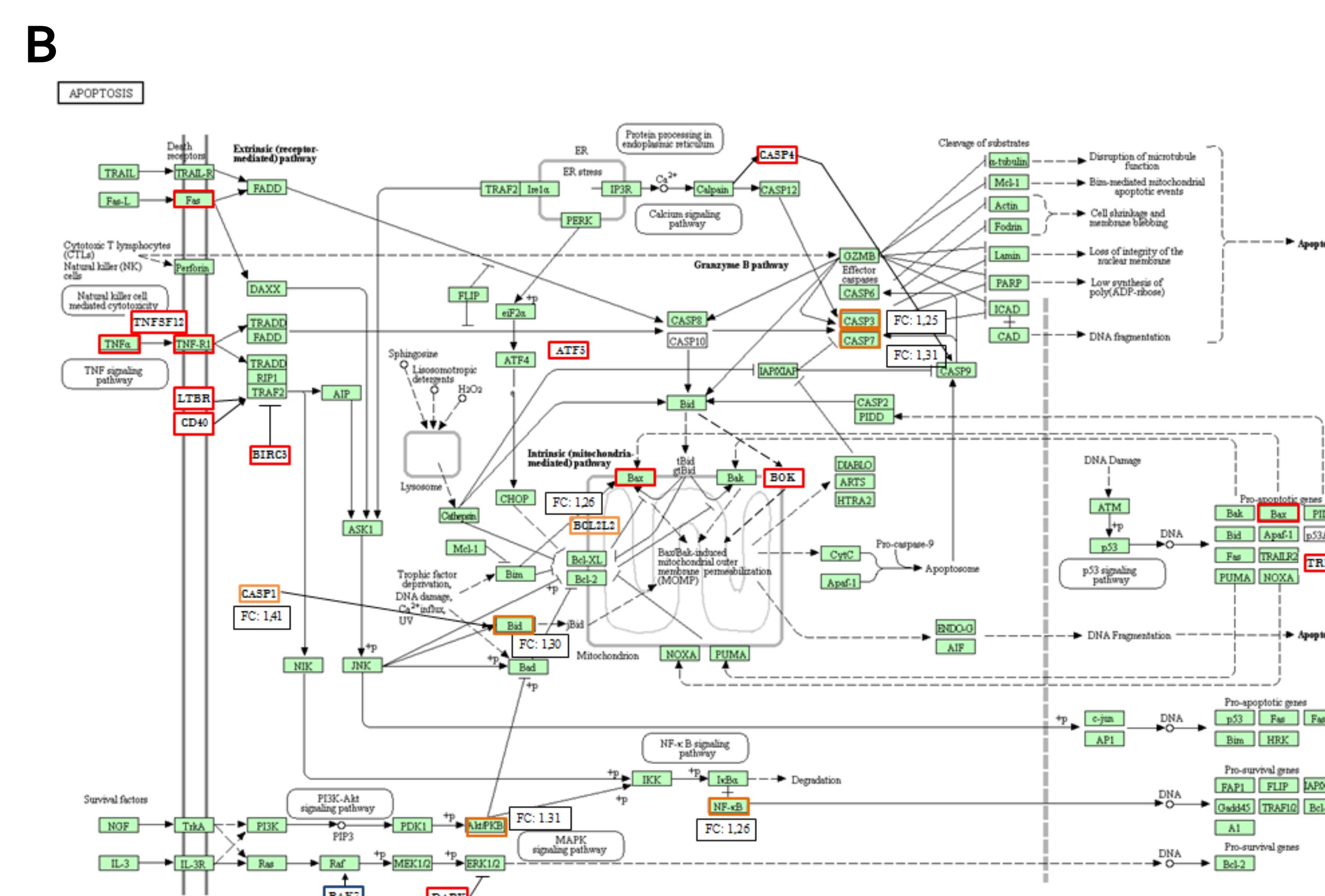
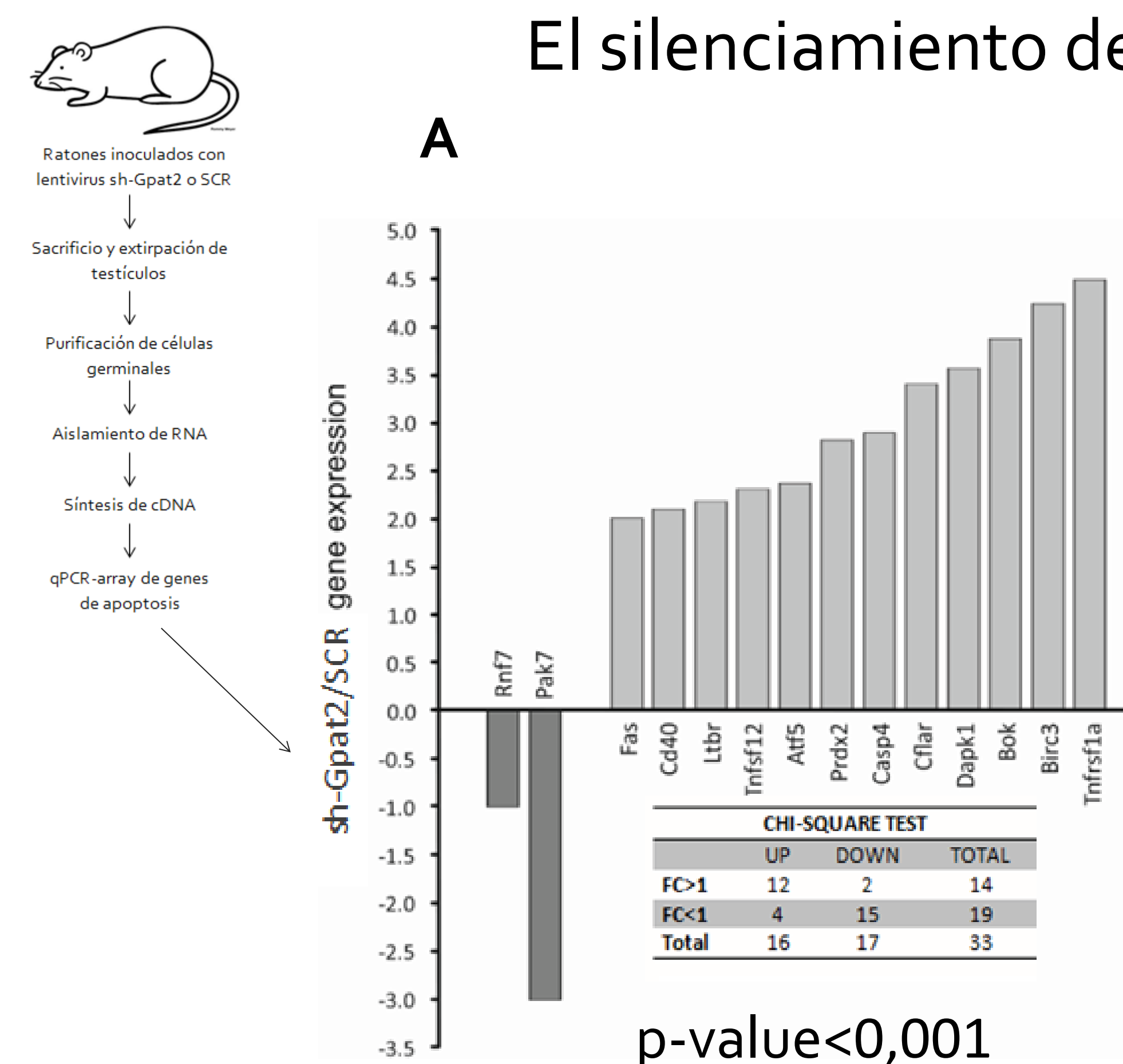
Chequeo por Western blot de la presencia de GPAT2 en homogenato de testículos inoculados con lentivirus.

El silenciamiento de *Gpat2* *in vivo* altera la histología testicular, disminuyendo el número de células germinales en división



Evaluación de la presencia de GPAT2 por IHQ en cortes de testículos 1 mes después de haber sido inyectados con lentivirus SH-*Gpat2* o SCR. Se muestran tres IHQ representativas de los resultados obtenidos en un experimento en el que se inyectaron 4 ratones de 11 dpp con lentivirus SH-*Gpat2* y 4 ratones con un lentivirus SCR. Se analizaron las IHQ de 6 cortes histológicos de los testículos de cada ratón. Los aumentos de cada foto se indican en la esquina inferior derecha de las mismas. Barras de escala: 50 μ m.

El silenciamiento de *Gpat2* aumenta la expresión de genes relacionados con la apoptosis



Análisis de expresión de genes vinculados con las vías de apoptosis. A) Resultado del screening de la expresión de genes relacionados con la apoptosis en células germinales de ratones sh-*Gpat2* y SCR. Se muestra la relación de la expresión sh-*Gpat2*/SCR de aquellos genes significativamente desregulados. B) Vías apoptóticas según KEGG 2016. En rojo se marcaron los genes significativamente sobreexpresados en los ratones sh-*Gpat2*, en azul los significativamente subexpresados y en naranja aquellos sobreexpresados, pero marginalmente significativos. C) Análisis funcional por Gene Ontology de genes sobreexpresados en sh-*Gpat2*. Las vías de TNF- α y NF- κ B fueron las más afectadas.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

- GPAT2 es una proteína de importancia para la progresión de la espermatogénesis. El silenciamiento de este gen en testículo produce una disminución del número de células en división y un aumento de la expresión de genes relacionados con la apoptosis. Por lo tanto, se podría decir que esta proteína está relacionada con la supervivencia de las células germinales al influir sobre la expresión de genes vinculados con las vías de apoptosis.
- Harán falta más experimentos para terminar de definir el mecanismo por el cual GPAT2 controla las vías apoptóticas y promueve la progresión de la espermatogénesis.