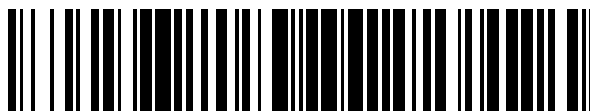


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 579 995**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/34 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

C12N 9/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2005 E 05745594 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016 EP 1765997**

54 Título: **Modulando la actividad de triglicérido hidrolasa**

30 Prioridad:

27.05.2004 AT 9242004

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

18.08.2016

73 Titular/es:

**KARL-FRANZENS-UNIVERSITAT GRAZ (100.0%)
UNIVERSITATSPLATZ 3
8010 GRAZ, AT**

72 Inventor/es:

**ZECHNER, RUDOLF;
ZIMMERMANN, ROBERT;
STRAUSS, JULIANE, G.;
HÄMMERLE, GÜNTER y
LASS, ACHIM**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 579 995 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Modulando la actividad de triglicérido hidrolasa

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención proporciona un anticuerpo como inhibidor de la actividad de la triglicérido lipasa adiposa codificada por una secuencia de ADN que comprende la secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 para su uso en el tratamiento de la obesidad, la diabetes de tipo 2 o el síndrome metabólico.

10 La presente invención proporciona también un procedimiento para determinar la actividad triglicérido hidrolasa de una proteína que comprende una cadena polipeptídica codificada por la secuencia de ADN de acuerdo con la SEQ NO. 1 en una muestra acuosa en presencia de lipasa sensible a hormonas (HSL), caracterizado por que se añade halogenuro de metal alcalino a la muestra en una cantidad eficaz para suprimir la actividad de dicha lipasa sensible a hormonas, después de lo que se determina la actividad de triglicérido hidrolasa.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 Los animales, las plantas de semillas y los hongos, almacenan comúnmente cantidades excesivas de sustratos de energía en forma de depósitos de triglicéridos (TG) intracelulares. En los mamíferos, los TG se almacenan en el tejido adiposo que proporciona la principal fuente de energía durante los períodos de privación de alimentos. La homeostasis de la energía del cuerpo total depende del equilibrio regulado con precisión de la movilización y el almacenamiento de los lípidos. La movilización de la grasa almacenada depende críticamente de la activación de las enzimas lipolíticas, que degradan los TG adiposos y liberan ácidos grasos (AG) no esterificados en la circulación sanguínea. La desregulación de la lipólisis de los TG en el ser humano se ha relacionado con la variación de la concentración de los AG en circulación, un factor de riesgo establecido para el desarrollo de resistencia a la insulina (1-4).

20 Durante los períodos de demanda de energía incrementada, la lipólisis en los adipocitos se activa por hormonas, tales como catecolaminas. La interacción de hormonas con los receptores acoplados a proteína G está seguida por una actividad de adenilato ciclasa incrementada, niveles de AMPc incrementados, y la activación de la proteína cinasa dependiente de AMPc (proteína cinasa A, PKA) (5). La PKA fosforila dos dianas importantes con una función establecida en la lipólisis: la lipasa sensible a hormonas (HSL), única enzima conocida actualmente que catabolice los TG del tejido adiposo y la perilipina A, una proteína abundante que se encuentra en la superficie de las gotículas lipídicas. Estas modificaciones dan como resultado la traslocación de HSL desde el citoplasma a la gotícula lipídica, donde se produce la hidrólisis eficaz de los TG (6).

30 Los modelos actuales representan HSL como la enzima que limita la tasa de movilización de los TG. Sin embargo, las observaciones recientes en ratones a los que se les ha eliminado el gen HSL (HSL knock-out o HSL-ko) son incompatibles con las predicciones de estos modelos: el tejido adiposo sin HSL conserva una capacidad lipolítica basal notable y estimulada por PKA (7, 8) y los ratones HSL-ko mostraron un peso corporal normal y no eran obesos. En su lugar, estos animales mostraron una reducción de la masa de tejido adiposo (9, 10) debido a la regulación a la baja de la síntesis de triglicéridos (10). La acumulación de diglicéridos (DG) en diversos tejidos de ratones HSL-ko sugiere que HSL en realidad limita la tasa hidrolítica de los DG in vivo, pero no el catabolismo de los TG (7). Estos resultados implican la existencia de una o más lipasas no identificadas en el tejido adiposo que preferentemente hidrolizan el primer enlace éster (sn-1 o sn-3) de la molécula de los TG. El documento WO 01/07628 divulga una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 9 de la misma, en el que dicho documento no divulga ninguna función de la proteína. También se divulga un anticuerpo que se une específicamente a la proteína. Miles (Diabetes care 25(7): 1123-1128 (2002)), Hollander (Diabetes care 21(8): 1288-1294 (1998)) and Hollander (Prim Care Clin Office Pract 30: 427-440 (2003)) divulgan el uso del inhibidor de lipasas orlistat en el tratamiento de la obesidad, así como de los pacientes con sobrepeso y obesos con diabetes de tipo 2.

SUMARIO DE LA INVENCION

45 En el presente documento se divulga una lipasa expresada en el tejido adiposo que cumple los requisitos de una TG-hidrolasa enzimáticamente activa que también se expresa en niveles altos en el tejido adiposo murino. Para el propósito de la presente memoria descriptiva, la lipasa se denomina "triglicérido lipasa adiposa" (ATGL). ATGL tiene actividad de triglicérido hidrolasa.

50 El ADN que codifica la lipasa comprende la secuencia de acuerdo con la SEQ NO. 1. Esta secuencia es idéntica a la secuencia codificadora 203 a 1717 de entrada de nucleótidos del NCBI de acceso NM_020376 (gi: 34147340). La modulación de la actividad de ATGL afecta a la liberación de ácidos grasos libres del tejido adiposo y en consecuencia a la concentración plasmática de ácidos grasos libres, triglicéridos y glucosa. La modulación de la liberación de ácidos grasos libres del tejido adiposo es deseable en trastornos como la obesidad, la diabetes de tipo 2 y el síndrome metabólico.

55 La actividad de ATGL puede modularse por medio de inhibidores o activadores. Un activador útil para potenciar la actividad de ATGL es CGI-58 (identificación de genes comparativa 58) como se describe en el presente documento.

En consecuencia, la presente invención se refiere al uso de CGI-58 (identificación de genes comparativa 58) como activador de una proteína que comprende una cadena polipeptídica codificada por la secuencia de ADN de acuerdo con la SEQ NO. 1 *in vitro*. En el presente documento se identifica que los inhibidores de lipasas y anticuerpos conocidos pueden ser útiles como inhibidores contra ATGL. Por lo tanto, la invención se dirige a un anticuerpo como inhibidor de la actividad de triglicérido lipasa adiposa codificada por una secuencia de ADN que comprende la secuencia de acuerdo con la SEQ NO. 1 para su uso en el tratamiento de la obesidad, la diabetes de tipo 2 o el síndrome metabólico.

La invención también está dirigida a un procedimiento para determinar la actividad triglicérido hidrolasa de una proteína que comprende una cadena polipeptídica codificada por la secuencia de ADN de acuerdo con la SEQ NO. 1 en una muestra acuosa en presencia de lipasa sensible a hormonas (HSL), caracterizado por que se añade halogenuro de metal alcalino a la muestra en una cantidad eficaz para suprimir la actividad de dicha lipasa sensible a hormonas, después de lo que se determina la actividad de triglicérido hidrolasa de ATGL. Se ha descubierto que un halogenuro de metal alcalino puede suprimir selectivamente la actividad de HSL.

En un modo de realización preferido del procedimiento de acuerdo con la invención, dicho halogenuro de metal alcalino es cloruro de potasio.

Estos procedimientos son, por tanto, herramientas de diagnóstico útiles para determinar la actividad de ATGL en plasma o cualquier otro fluido corporal.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La siguiente parte experimental realizó con el ratón ATGL, el ADNc del cuales presenta más de un 96 % de homología con el ADN humano que codifica la ATGL humana.

El ADNc de longitud completa de ATGL que contiene la ORF completa se amplificó por RT-PCR a partir del ARN total de tejido adiposo blanco de ratón y se secuenció el ADN. La secuencia de nucleótidos de la ATGL ratón se muestra como SEC N.º: 2 y presenta un 100 % de identidad con la secuencia de nucleótidos del NCBI con número de acceso AK031609 (gi: 26327464). La secuencia codificadora de 1.460 pb especifica una proteína putativa de 486 aminoácidos (número de acceso del NCBI BAC27476) con un peso molecular calculado de 53.652 D. El análisis de bandas Northern del ARN total de diversos tejidos de ratón C57B16 revelaron que el ARNm de ATGL se expresa mucho en el tejido adiposo blanco y marrón (figura 1 A). Adicionalmente, se observaron señales débiles de ARNm de ATGL en los testículos, el músculo cardíaco y el músculo esquelético. Durante un estudio de evolución temporal de la diferenciación de adipocitos 3T3-L1 murinos, la expresión del ARNm ATGL se detectó primero 4 días después de la inducción de la diferenciación y se obtuvo un máximo de expresión en el día 6 (figura 1B). Este perfil de expresión del ARNm es típico de los marcadores tardíos de la diferenciación de los adipocitos y se asemeja el patrón de expresión del ARNm de HSL (no mostrado).

Para investigar si ATGL hidroliza lípidos neutros, Se expresó temporalmente ATGL marcada con His en células COS-7 utilizando un vector de expresión eucariota. Para la comparación, las células COS-7 también se transfecaron con una construcción similar que expresa HSL marcada con His. Tanto la proteína ATGL como la HSL marcadas con His se detectaron mediante análisis de bandas Western en el sobrenadante citosólico y en la fracción de sedimento de membrana de las células COS transfectadas (figura 1C). Los pesos moleculares aparentes de ATGL y HSL se estimaron en 54 kD y 84 kD, respectivamente. Cuando se preincubaron los extractos de las células transfectadas con un inhibidor de lipasas fluorescente (NBD-HEHP) (11) y posteriormente se sometieron a un análisis SDS-PAGE y fluorografía, se observaron señales fluorescentes en posiciones correspondientes al peso molecular esperado de ATGL y HSL (figura 1C). El hecho de que la sonda fluorescente solo reacciona con Ser-lipasas enzimáticamente activas (11) proporcionó evidencia de que ATGL es enzimáticamente activa en células COS transfectadas. Para confirmar esto, se realizaron ensayos de actividad de TG-hidrolasa usando como sustrato [9,10-3H (N)] - trioleína marcada radiactivamente (figura 1D).

Las fracciones citosólicas de las células COS-7 transfectadas con ATGL mostraron un notable aumento de la actividad de TG hidrolasa (3,7 veces en comparación con las células control transfectadas con LacZ). No se observaron actividades enzimáticas cuando se usaron como sustratos lipídicos palmitato de retinilo, oleato de colesterilo o fosfatidilcolina marcados radiactivamente. De acuerdo con los datos anteriores (12, 13), las fracciones citosólicas de las células transfectadas con HSL presentan una mayor actividad de TG hidrolasa (4,2 veces), colesteriléster hidrolasa (23 veces), y retiniléster hidrolasa (2,3 veces) en comparación con las células transfectadas con LacZ. Por lo tanto ATGL posee actividad de triglicérido hidrolasa, pero en contraste con HSL, esta enzima parece ser específica de sustrato para TG y no hidroliza enlaces colesteriléster o retiniléster.

Para especificar la función de ATGL en catabolismo de los TG en comparación con HSL, se determinó la abundancia relativa de productos de reacción lipolítica después de la incubación de un sustrato marcado de [9,10-3H(N)]-trioleína con extractos citosólicos de células COS-7 transfectadas con ATGL o HSL. Los productos de reacción se separaron mediante TLC y se cuantificaron mediante recuento de centelleo de las distintas fracciones lipídicas (figura 2). Comparados con los extractos control de las células transfectadas con LacZ, los extractos de células transfectadas con ATGL y HSL contenían actividades 7,5 y 10 veces más altas, respectivamente (figura 2A). En

5 presencia de ATGL la acumulación de diacilglicerol (DG) aumentó 21 veces en comparación con las células transfectadas con LacZ lo que sugiere que la enzima hidroliza predominantemente el primer enlace éster de los TG (figura 2B). El análisis de TLC de los isómeros de DG indica una fuerte preferencia de ATGL por la posición sn-1 de los TG (no mostrado). En contraste, los ensayos de lipólisis con extractos citosólicos de células transfectadas con HSL no supusieron la acumulación de DG. El hallazgo de una escisión eficaz de DG por HSL observado aquí es consistente con la alta especificidad de sustrato de HSL observada previamente por los DG (10 veces mayor que por los TG) (14). La acumulación de monoglicéridos d(MG) fue solo apenas detectable con extractos de células transfectadas con ATGL y HSL (figura 2C). A partir de las proporciones molares de la acumulación de DG y MG en comparación con la liberación de AG se puede calcular que aproximadamente el 90 % de las moléculas de AG liberadas en presencia de ATGL proceden de la hidrólisis de los TG en el primer enlace éster. Por el contrario, en presencia de HSL, se originan más AG a partir de los tres enlaces éster que resultan en la formación de glicerol. Por lo tanto, los resultados demuestran que ATGL y HSL poseen claramente diferentes de especificidades de sustrato dentro de la cascada lipolítica, lo que sugiere que podrían actuar coordinadamente en el catabolismo de los TG.

10 Esta suposición se confirmó por los perfiles de los productos generados en los ensayos de hidrólisis de trioleína utilizando los extractos combinados de células transfectadas con LacZ, ATGL y HSL (figura 2E). En relación con los extractos de células transfectadas con LacZ, la actividad de acilhidrolasa aumentó en mezclas de igual volumen de extractos HSL/LacZ (4,8 veces), extractos ATGL/LacZ (4 veces) y extractos ATGL/HSL (16 veces). La acumulación de DG aumentó 12,5 veces cuando se utilizaron extractos LacZ/ATGL y se redujeron a niveles basales con /extractos ATGL/HSL (figura 2F).

15 Sin estar relacionado en teoría, teniendo en cuenta esta marcada diferencia en la especificidad de sustrato de ATGL y HSL, se cree que durante la descomposición lipolítica de los TG, ATGL es predominantemente responsable de la etapa inicial de hidrólisis de los TG mientras que HSL actúa para hidrolizar los DG resultantes en monoglicéridos. Estos, a su vez, se convierten en AG y glicerol por acción de la monoglicérido lipasa (15). Este modelo se apoya en un notable efecto cooperativo observado en la presencia combinada de ATGL y HSL. Como se muestra en la figura 2E, la actividad de acilhidrolasa total en extractos con ATGL/HSL fue casi el doble que la suma de las actividades individuales.

20 Para determinar si ATGL es funcional también en los adipocitos, se construyó un adenovirus recombinante que codifica el ADNc de ATGL de ratón de longitud completa marcado con His y se usó para infectar adipocitos 3T3-L1 de ratón el día 6 de diferenciación. Los análisis de bandas Western de los extractos celulares de los adipocitos infectados revelaron una expresión de ATGL marcada con His en el peso molecular correspondiente (figura 3A). Se descubrió que la enzima está estrechamente asociada a gotículas lipídicas de adipocitos, incluso después de una purificación extensiva de las gotículas por centrifugación múltiple (16). La estimulación de la lipólisis por isoproterenol no afectó a la localización de la enzima lo que indica una asociación constitutiva de ATGL con las gotículas lipídicas de los adipocitos. Además, las células 3T3-L1 que expresan ATGL liberaron mayores niveles de AG (5 veces) y glicerol (1,8 veces) en comparación con las células infectadas con LacZ en condiciones basales. Después de la estimulación con isoproterenol, la liberación de AG aumentó 1,8 veces y la liberación de glicerol 2,9 veces en comparación con las células de control que expresan LacZ. Por lo tanto, la sobreexpresión de ATGL en los adipocitos puede aumentar notablemente la lipólisis basal y la estimulada con isoproterenol, indicativo de una lipasa funcional en el tejido adiposo.

25 En resumen, ATGL es una TG hidrolasa potente con poca o ninguna especificidad por DG, colesteriléster, retiniléster y fosfatidilcolina. La enzima de ratón se expresa predominantemente en el tejido adiposo. Está asociada a gotículas lipídicas y potencia la liberación de AG basal y β -adrenérgica. Aunque el mecanismo de regulación de la activación de ATGL aún no se han dilucidado, estos hallazgos sugieren que la enzima es un componente importante del proceso lipolítico y la movilización de los depósitos de lípidos en mamíferos.

30 También se estudió la idoneidad de CGI-58, un gen que codifica una proteína asociada a gotículas lipídicas con función desconocida como un activador de la ATGL. Se descubrió que dicho gen presenta mutaciones en sujetos que padecen el síndrome de Chanarin-Dorfman (CDS), que es una enfermedad rara autosómica recesiva caracterizada por la acumulación intracelular de triglicéridos en múltiples vacuolas en la mayoría de los tejidos y en los granulocitos de la sangre. Para investigar si CGI-58 puede afectar a la actividad de TGH celular de una manera comparable con ATGL o HSL, se transfectaron células de riñón de mono transformadas con el virus de simio 40 (COS-7) con clones de ADNc que expresan CGI-58, ATGL, HSL murinas marcadas con His o o LacZ como control. La expresión de las respectivas proteínas en células COS-7 se confirmó mediante bandas Western (Fig. 6a) y los extractos citoplasmático de las células transfectadas se sometieron a un ensayo TG hidrolasa. Como se muestra en la Fig. 6b, la expresión de CGI-58 aumentó la actividad de TGH en un 76 % en comparación con las células transfectadas con LacZ. En comparación, la transfección de células con ATGL y HSL aumentó la actividad de TGH en 4 y 9 veces, respectivamente. Para investigar si el efecto de CGI-58 se debe a la actividad de TGH endógena de CGI-58 o si la proteína afecta a la actividad de otras lipasas, se mezclaron extractos de células que expresan, CGI-58 y ATGL o HSL y se analizó la actividad de TGH (Fig. 6c). En presencia de ATGL y CGI-58, la actividad de TG hidrolasa potenció 80 veces en comparación con el control LacZ, lo que indica que CGI-58 aumenta sustancialmente la actividad de ATGL. Por el contrario, CGI-58 no tuvo ningún efecto sobre la actividad de la lipasa sensible a hormonas, lo que sugiere que la proteína activa específicamente ATGL (Fig. 6c). Un experimento de dosis-respuesta reveló que la actividad máxima de ATGL se logró en una proporción molar CGI-58/ATGL de aproximadamente 0,5

(fig. 6d). La activación de ATGL por CGI-58 también puede controlarse a nivel molecular usando el inhibidor de lipasas NBD-sn1TG marcado con fluorescencia. Al imitar una molécula de TG, este inhibidor se une covalentemente a las lipasas activas. Como se muestra en la Fig. 6e, en presencia de CGI-58 la señal fluorescente para ATGL en extractos citoplasmáticos aumentó unas 5 veces. Por lo tanto, los resultados sugieren que CGI-58 puede aumentar la actividad de TGH celular por activación de ATGL.

Para comparar las actividades de las proteínas humanas y murinas, se expresó CGI-58 (hCGI-58) humano y ATGL (hATGL) humana en células COS-7 y se realizó un ensayo de actividad de TGH (Fig. 6f). De manera similar, como se muestra para las proteínas de ratón, hCGI-58 aumentó la actividad de hATGL de manera dependiente de la dosis. En comparación con los ortólogos de ratón (Fig. 6D), la magnitud del efecto máximo sobre la activación de ATGL fue menor (6 veces frente a 20 veces), los que sugiere diferencias dependientes de la especie en las actividades específicas de las proteínas humanas y de ratón.

En resumen, el estudio sobre CGI-58 proporciona pruebas de que CGI-58 actúa como activador de la ATGL y por lo tanto puede potenciar la capacidad celular para movilizar los ácidos grasos libres a partir de la reserva de TG.

Materiales y procedimientos

Clonación de ADNc y expresión temporal de proteínas recombinantes marcadas con His en células COS-7 y adipocitos 3T3-L1. Las secuencias codificadoras de ATGL y HSL se amplificaron por PCR a partir de ADNc preparado a partir de ARNm de tejido adiposo blanco ratón por transcripción inversa. El marco de lectura abierto, flanqueado por los sitios KpnI/XhoI para ATGL y HSL se clonaron en el vector de expresión eucariota pcDNA4/HisMax (Invitrogen). La transfección de células COS-7 se realizó con Metafectene™ (Biontex) de acuerdo con la descripción del fabricante. Los cebadores de PCR utilizados para generar estas sondas fueron los siguientes

ATGL directo 5'-TGGTACCGTTCCCGAGGGAGACCAAGTGGA-3',

ATGL inverso 5'-CCTCGAGCGCAAGGCGGGAGGCCAGGT-3'.

HSL directo 5'-TGGTACCT-ATGGATTTACGCACGATGACACA-3'.

HSL inverso 5'-CCTCGAGCGTTCAGTGGTGCAGCAGGCG-3'.

Clonación del ADNc de proteínas recombinantes marcadas con His para investigaciones sobre CGI-58 - . Se aisló el ARN total de tejido adiposo de ratón y humano utilizando el procedimiento de reactivo Trizol® de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Se aisló el ARN poli A+ a partir del ARN total usando el kit Oligotex® mRNA Mini Kit from Qiagen GmbH (Hilden, Alemania). El ARNm se transcribe en la primera cadena de ADNc utilizando el protocolo de la Superscript™ Reverse Transcriptase de Invitrogen Life Technologies. La segunda cadena de ADNc se obtuvo por adición de los productos E. coli DNA ligase buffer, E. coli DNA polymerase, E. coli DNA ligase (todos reactivos de New England Biolabs Inc., Beverly, MA), y dNTP (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Alemania) a la mezcla y una posterior incubación a 16 °C durante 3 h. Después, se añadió AT4 DNA polymerase (New England Biolabs Inc.) y se incubó durante otros 20 minutos para dar lugar al ADNc de extremos romos. Se amplificaron por PCR las secuencias codificadoras de ATGL, HSL, CGI-58 de ratón y ATGL humana (TTS-2.2) a partir de ADNc de tejido adiposo de ratón y humano usando el kit Advantage® cDNA Polymerase Mix (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA), respectivamente. Los cebadores se diseñaron para crear sitios de escisión para las enzimas de restricción KpnI (5') y XhoI (3') para ATGL y HSL de ratón y sitios BamHI (5') y XhoI (3') para la ATGL humana:

ATGL de ratón directo 5'-TGGTACCGTTCCCGAGGGAGACCAAGTGGA-3',

ATGL de ratón inverso 5'-CCTCGAGCGCAAGGCGGGAGGCCAGGT-3',

HSL de ratón directo 5'-TGGTACCTATGGATTTACGCACGATGACACA-3'.

HSL de ratón inverso 5'-CTCGAGCGTTCAGTGGTGCAGCAGGCG-3',

CGI-58 de ratón directo 5'- -3',CGGATCCAAAGCGATGGCGGCGGAGGA,

CGI-58 de ratón inverso 5'- -3',CCTCGAGTCAGTCTACTGTGTGGCAGATCTCC,

ATGL humana directo 5'-CGGGATCCTTTCCCCGCGAGAAGACGTG-3',

ATGL humana inverso 5'-CCCTCGAGCTCACAGCCCCAGGGCCCC-3',

Los productos de PCR, que contienen el marco de lectura abierto completo, se ligaron a los sitios de restricción compatibles del vector de expresión eucariota pcDNA4/HisMax (Invitrogen Life Technologies). El fabricante proporcionó un vector pcDNA4/HisMax control que expresa β-galactosidasa (lacZ) (Invitrogen Life Technologies).

Construcción del adenovirus recombinante para la expresión de ATGL (ATGL-Ad) y la infección de las células 3T3-

5 *L1*: El adenovirus recombinante que codifica la ATGL de ratón se preparó por cotransfección del plásmido lanzadera pAvCvSv que contiene el ADNc de ATGL y PJM 17 en células HEK-293. Se amplificó por PCR el fragmento de ADNc (incluido la marca His) de ATGL de 1,65 kb flanqueado por Mlu I - Cla I a partir del vector de expresión eucariota pcDNA4/HisMax que contiene el ADNc de ATGL de ratón y se subclonó en el pAvCvSv digerido con Mlu I - Cla I. Se cotransfectaron células HEK-293 con el plásmido lanzadera resultante junto con PJM 17 en utilizando el procedimiento de coprecipitación con fosfato de calcio. La producción a gran escala de más cantidad de ATGL-Ad
10 recombinante se realizó como se describe en otro documento. Se cultivaron los fibroblastos 3T3-L1 en DMEM con 10 % de FCS y se diferenciaron usando un protocolo estándar (27). Los adipocitos se infectaron el día 8 de diferenciación con una multiplicidad de infección (mdi) de ~ 400 unidades formadoras de placa/célula. Para ese propósito preactivaron las ufp apropiadas en DMEM que contenían 0,5 µg/ml de polilisina durante 100 minutos y después se incubaron las células con esta suspensión de virus durante 24 horas. Después de 24 h se retiró el medio y se incubaron las células durante otras 24 h con medio completo. Para la mayoría de los experimentos, se utilizó como control el adenovirus recombinante que expresa β-galactosidasa (LacZ-Ad).

15 *Expresión de proteínas recombinantes en células cultivadas para investigar el CGI-58*. Se mantuvieron células de riñón embrionarias de mono (COS-7, ATCC CRL-1651) en medio esencial mínimo de Dulbecco (DMEM) (Gibco, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) con 10 % de suero fetal de ternera (FCS) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) y antibióticos a 37 ° C en una atmósfera humidificada (89 a 91 % de saturación) y 5 % de CO₂. El día antes de la transfección, se recogieron las células COS-7 en la fase logarítmica, se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 150.000 células/pocillo y se cultivaron durante la noche. La transfección temporal de células COS-7 con el vector pcDNA4/HisMax que codifica proteínas marcadas con His se realizó con Metafectene™ (Biontex GmbH, Munich, Alemania). Entre uno y dos µg de ADN plásmido purificado (NucleoBond® AX, GmbH & Co. KG, Düren, Alemania) se mezclaron con 5 µl de Metafectene en un volumen total de 100 µl de DMEM sin suero ni antibióticos y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación del complejo de ADN/Metafectene. Después, se añadieron 100 µl/pocillo de la mezcla de ADN/Metafectene y se incubaron durante
20 4 horas en el DMEM sin suero ni antibióticos. Después, se retiró el medio y las células se cultivaron en DMEM con 10 % de FCS y antibióticos. Las células se analizaron dos días después de la transfección.

25 *Fraccionamiento subcelular de células COS-7*. Las células COS-7 transfectadas se recogieron por tripsinización y se lavaron tres veces con PBS. Las células se rompieron en hielo con tampón de lisis (sacarosa 0,25 M, EDTA 1 mM, ditiotreitól 1 mM, 20 µg/ml de leupeptina, 2 µg/ml de antipaina, 1 µg/ml de pepstatina, pH 7) por tratamiento con ultrasonidos (Virsonic 475). Los núcleos y materiales sin romper se eliminaron mediante centrifugación a 1.000 g a 4 ° C durante 15 min para obtener los extractos citoplasmáticos. Los extractos citoplasmáticos se centrifugaron a 100,00 g a 4 ° C durante una hora para obtener extractos citosólicos y sedimentos de membrana.

30 *Aislamiento de gotículas lipídicas*. Se rompieron los adipocitos 3T3-L1 de dos placas de 10 cm en tampón A (tricina 20 mM, pH 7,8, sacarosa 0,25 M, MgCl₂ 2 mM, PMSF 0,2 mM por tratamiento con ultrasonidos (Virsonic 475). Se recubrieron 6 ml de tampón A con 6 ml de tampón B con Hepes 20 mM (pH 7,4), KC1 100 mM, MgCl₂ 2 mM, PMSF 0,2 mM y se centrifugaron durante 3 horas a 40.000 rpm a 4 ° C. Se recogieron las gotículas lipídicas que se concentran en la parte superior del tubo y se lavaron varias veces con tampón B como se describe (28).

35 *Análisis de Western*. Las proteínas celulares se separaron mediante electroforesis en gel de poli(acrilamida) con SDS y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell, Alemania). Para la detección de las proteínas marcadas con His, las bandas se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti-His diluido 1/10000 (6xHis, Clontech). La perilipina se detectó utilizando un anticuerpo policlonal de cobaya contra perilipina A y B (PROGEN). Las inmunoglobulinas unidas se detectaron con un conjugado de IgG marcados con HRP (Vector Inc.) y se visualizaron por detección ECL (ECL plus, Amersham Pharmacia Biotech, Alemania) en un sistema de análisis de imagen Storm. La cuantificación se realizó utilizando el software ImageQuant.

40 *Análisis de bandas Western para investigaciones de CGI-58*. Las células COS-7 transfectadas se solubilizaron en tampón de muestra SDS-PAGE, las proteínas celulares se separaron en un gel de SDS-PAGE al 10 % usando el sistema de tampón discontinuo de Laemmli (ref) y se transfirieron a una membrana de transferencia de poli(fluoruro de vinilideno) (Pall Life Sciences, Pensacola, FL). La membrana se bloqueó con un 2 % de leche en polvo de calidad para transferencia (Carl Roth GmbH & Co.) en Tris/NaCl/Tween 20 y se incubó con el anticuerpo monoclonal anti-His de ratón (6xHis, Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ) a una dilución de 1:7000. Las bandas se lavaron 3 veces en Tris/NaCl/Tween 20 durante 10 min, después de la incubación con anticuerpo de oveja anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano (Amersham Biosciences Corp.) a una dilución de 1:10.000, las membranas se revelaron con quimioluminiscencia potenciada (ECL plus, Amersham Biosciences Corp.) y se expusieron a una película de rayos x (Hyperfilm™ ECL, Amersham Bioscience Corp.).

45 *Reacción de ATGL y HSL con el inhibidor de lipasas fluorescente NBD-HEHP*. Las células COS-7 transfectadas se lavaron dos veces con PBS, se rasparon en tampón de lisis (sacarosa 0,25 M, EDTA 1 mM, ditiotreitól 1 mM, 20 µg/ml de leupeptina, 2 µg/ml de antipaina, 1 µg/ml de pepstatina) y se rompieron en hielo por tratamiento con ultrasonidos. Los núcleos y materiales sin romper se eliminaron mediante centrifugación a 1.000 g a 4 ° C durante 15 min para obtener los extractos citoplasmáticos. Se incubaron 50 µg de proteína con 1 nmol de inhibidor de lipasas marcado con fluorescencia, el éster p-nitrofenílico del ácido O-((6-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)amino)hexanoil)aminoetil-O-(n-hexil) fosfónico (NBD-HEHP) (29) y Triton X-100 1 mM (especialmente purificado
50 60

para la investigación en membrana, Hofmann LaRoche) a 37 ° C durante 2 horas con agitación. La proteína se precipitó con TCA al 10 % durante 1 hora en hielo, se lavó con acetona y se separó en gel SDS-PAGE 10 %. Los geles se fijaron en 10 % de etanol y ácido acético 7 %. La fluorescencia se detectó con un BioRad FX Pro Laserscanner (excitación 488 nm, emisión 530 nm).

5 *Análisis de Northern.* La sonda de ADNc para el análisis de bandas Northern de ATGL de ratón se preparó por RT-PCR usando la primera cadena de ADNc a partir del ARNm de grasa de ratón. Los cebadores de PCR utilizados para generar esta sonda fueron como sigue: directo 5'-TGGAACATCTCATTGCTGG-3' inverso 5'-AATGCCGCCATCCACATAG-3'. El ARN total se aisló de diversos tejidos de ratón utilizando el procedimiento del TRI Reagent de acuerdo con el protocolo del fabricante (Molecular Research Center, Karlsruhe, Alemania). Se detectaron ARNm específicos utilizando técnicas de bandas Northern estándar con 10 µg de ARN total. Se generaron sondas marcadas con ³²P para la hibridación usando cebadores aleatorios. Las bandas Northern se visualizaron por exposición a una pantalla PhosphorImager (APBiotech, Freiburg, Alemania) y se analizaron utilizando ImageQuant Software.

15 *Ensayo de la actividad de TG lipasa, colesterilesterasa, retinilesterasa y fosfolipasa.* Para la determinación de la actividad de lipasa se incubaron 0,1 ml de extractos citosólicos y 0,1 ml de sustrato en un baño de agua a 37 ° C durante 60 minutos. La reacción se detuvo añadiendo 3,25 ml de metanol/cloroformo/heptano (10:9:7) y 1 ml de carbonato de potasio 0,1 M, ácido bórico 0,1 M, pH 10,5. Después de centrifugar (800 g, 20 min) se determinó la radiactividad en 1 ml de la fase superior por recuento de centelleo líquido. La actividad de lipasa neutra se midió en tampón de fosfato potásico 50 mM, pH 7,0 y 2,5 % de BSA desgrasada. El sustrato de la TG lipasa neutra contenía 33 nmol trioleína/ensayo con [9,10- H (N)]-trioleína (40.000 cpm/nmol, NEN Life Science Products) como trazador radioactivo para las células COS-7 y 167 nmol/ensayo para los adipocitos 3T3-L1 (7300 cpm/nmol). Los sustratos de la colesterilesterasa y de la actividad de retinilesterasa contenían 10 nmol/ensayo de oleato de colesterilo o palmitato de retinilo y los trazadores correspondiente colesteril[9,10-3H] -oleato o retinil[9,10-H³ (N)]-palmitato (50.000 cpm/nmol). Para la determinación de actividad de fosfolipasa en extractos citosólicos el sustrato contenía 20 nmol de fosfatidilcolina por ensayo y [dipalmitoil-I-C¹⁴] -fosfatidilcolina(12.000 cpm/nmol). Todos los sustratos se prepararon por tratamiento con ultrasonidos (Virsonic 475) esencialmente como se describe (30).

25 Para investigar la formación de DG en el ensayo *in vitro* la reacción se detuvo añadiendo 1 ml de CHCl₃/metanol (2:1) con ácido oleico (10 µg/ml) y estándares para monooleína y dioleína (sn-1,2 y sn -1,3; Sigma). La mezcla se agitó vigorosamente en un vórtex tres veces durante un período de 15 min. Después de centrifugar (4000 g, 10 min), se recogieron 0,5 ml de la fase inferior y se evaporaron en atmósfera de nitrógeno. El sedimento lipídico se disolvió en cloroformo y se cargó en una placa de TLC (Merck Silica gel 60). La TLC se desarrolló con cloroformo/acetona/ácido acético (96:4:1) como disolvente. Los lípidos se visualizaron con vapor de yodo y se cortaron las bandas correspondientes a monooleína, dileína, trioleína y ácido oleico. La comigración de la radiactividad se determinó por recuento de centelleo líquido.

35 *Determinación de los AG y la liberación de glicerol de los adipocitos 3T3-L1.* Las células se incubaron en medio DMEM (GIBCO) con 2 % de BSA sin ácidos grasos (Sigma) con o sin isoproterenol 10 mM (Sigma) a 37 ° C. Se recogieron las alícuotas del medio y se analizaron los ácidos grasos libres (AGL) y el contenido de glicerol utilizando kits comerciales (WAKO).

Descripción detallada de las figuras 1-3

40 Figura 1. Análisis de bandas Northern de la expresión del ARNm de ATGL en diversos tejidos de ratón y (A) durante la conversión en adipocitos de células 3T3-L1 (B). Se analizaron 10 µg de ARN total de ratones en ayunas o células 3T3 mediante un análisis de bandasNorthern y se detectó utilizando una sonda de ADN específica marcada con ³²P. Se utilizó como control. la proteína ribosomal PO. Se indujeron las células 3T3-L1 para que se diferenciaron en adipocitos dos días después de la confluencia (día 0) usando un protocolo de diferenciación estándar (24). (C) Análisis de bandas Western de ATGL marcada con His y HSL y reacción de las proteínas con el inhibidor de lipasas fluorescente NBD-HEHP. La transfección temporal de células COS-7 se realizó utilizando el vector de expresión eucariota pcDNA4/HisMax (Invitrogen) que codifica el ADNc marcado con His de longitud completa de ATGL o HSL. Las proteínas marcadas con His se detectaron por inmunotransferencia en extractos citosólicos (100,00 g de sobrenadante) y en la fracción de membrana (sedimento, 100,00 g de sedimento). Las tbandas se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti-His y un conjugado HRP-IgG-anti ratón y se visualizaron mediante detección en ECL. Para la reacción con NBD-HEHP, se incubaron los extractos citoplasmático con 1 nmol inhibidor de la lipasa marcado con fluorescencia y 1 mM Triton X-100 a 37 ° C durante 2 horas con agitación. Posteriormente, las muestras se corrieron en un gel SDS-PAGE y las proteínas marcadas se visualizaron en un BioRad FX Pro Laserscanner. (D) Actividad enzimática y especificidad de sustrato de ATGL. Los extractos citosólicos de células COS-7 que expresan ATGL, HSL o β-galactosidasa (lacZ) marcadas con His se sometieron a ensayo para determinar la actividad de lipasa utilizando sustratos que contienen trioleína, oleato de colesterilo, palmitato de retinilo o fosfatidilcolina radiomarcados. Los experimentos se realizaron por triplicado. Los datos se presentan como media ± D.T. y son representativas de al menos tres experimentos independientes.

60 Figura 2. Papel de ATGL en la cascada de hidrólisis de triglicéridos. Se incubaron extractos citosólicos de células COS-7, transfectadas temporalmente con LacZ, ATGL o HSL marcadas con His, con trioleína con [9,10-H³ (N)]-

trioleína como trazador radiactivo. Los lípidos se extrajeron y se separaron por TLC usando CHCl_3 /acetona/ácido acético (96/4/1) como fase móvil. Los lípidos se visualizaron con vapor de yodo y la comigración radiactiva con MG, DG, TG y los estándares de AG se determinó por recuento de centelleo líquido. (A) Actividad de acil-hidrolasa (AG) total. (B) Acumulación de DG. (C) Acumulación de MG. (D) Efecto de la actividad combinada de ATGL y HSL en la actividad de TG hidrolasa. Se mezclaron en proporción 1:1 extractos citosólicos de células COS que expresan LacZ con extractos de células que expresan ATGL o HSL (ATGL/LacZ y HSL/LacZ) y se compararon con los extractos preparados a partir de una mezcla de células que expresan ATGL y HSL (ATGL/HSL). (E) Efecto de la actividad combinada de ATGL y HSL en la acumulación de DG. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los datos se presentan como media \pm D.T. y son representativos de al menos tres experimentos independientes.

Figura 3. Localización celular, actividad lipolítica e inhibición dirigida por anticuerpos de ATGL en adipocitos. (A) Se utilizó un adenovirus recombinante que codifica ATGL marcada con His (ATGL-Ad) para infectar adipocitos el día 8 después de la inducción de la diferenciación y se realizaron los experimentos 2 días después de la infección. (16). Las células se cultivaron en medio DMEM (GIBCO) con 2 % de BSA sin ácidos grasos (Sigma) en ausencia o en presencia de isoproterenol (10 mM a 37 ° C durante dos horas) como se indica (+ iso) antes de recoger las células o el medio. Análisis de bandas Western de ATGL en la fracción citoplasmática (10 μg de proteína total) y en las gotículas lipídicas aisladas (2 μg de proteína total) de los adipocitos utilizando un-Su anticuerpo monoclonal anti. La purificación de gotículas lipídicas se controló mediante el enriquecimiento de perilipina (> 70 veces) utilizando un anticuerpo policlonal de conejo contra perilipina A y B (Progen). (B) Fotografía fluorescente de los adipocitos 3T3-L1 transfectados con GFP-ATGL. Se introdujo GFP-ATGL temporalmente en las células el día 8 después de la inducción de la diferenciación y las fotografías se realizaron 2 días después de la infección. (C) La liberación de glicerol y AG de los adipocitos infectados ATGL-Ad (se midieron en alícuotas de medio de cultivo utilizando kits disponibles comercialmente (WAKO). Se utilizaron como control adenovirus recombinantes que expresaban β -galactosidasa (LacZ). Los experimentos se realizaron por triplicado. Los datos se presentan como media \pm D.T. y son representativos de tres experimentos. (D) Inhibición de la actividad de acilhidrolasa citosólica en WAT y BAT por un anticuerpo policlonal contra ATGL de ratón (ATGL-IgG) utilizando [9,10- H^3 (N)]-trioleína marcada como sustrato. La actividad en los extractos citosólicos de ratones naturales y y HSL-ko se determinó ya sea en presencia de IgG (NI-IgG) o ATGL-IgG no inmune de conejo. Los datos se presentan como media \pm D.T. de tres ratones individuales para cada grupo y son representativos de dos experimentos.

Generación de un anticuerpo policlonal de conejo contra ATGL murina

Se utilizó el vector adenovirico recombinante con ADNc marcado con His para inmunizar un conejo. Se inyectaron partículas víricas (5×10^9 ufp/kg) en un conejo a través de la vena de la oreja. Se obtuvieron sueros inicialmente a las 6 semanas después de la infección y posteriormente en intervalos de 2 semanas para el análisis de la reactividad de anticuerpos en ensayos para TG hidrolasa y experimentos de bandas Western. Se utilizó como control suero de conejo no inmunizado. Las fracciones de IgG se aislaron a partir de suero de conejo utilizando una columna de proteína G (Amersham Pharmacia Biotech) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Determinación de la actividad de TG hidrolasa

La actividad de TG lipasa neutra se midió con trioleína como sustrato con [9,10- H^3 (N)]-trioleína (NEN Life Science Products) como trazador radiactivo. El sustrato para la actividad de TG lipasa se preparó por tratamiento con ultrasonidos (Virsonic 475) exactamente como describe en Holm *et al.* (30). Las células se rompieron en hielo con tampón de lisis (sacarosa 0,25 M, EDTA 1 mM, ditiotreitól 1 mM, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de leupeptina, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de antipaina, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de pepstatina, pH 7) por tratamiento con ultrasonidos (Virsonic 475). Los infranadantes citosólicos se obtuvieron después de centrifugar a 1000.000 g, a 4 ° C durante 60 min. La reacción se realizó en un baño de agua a 37 ° C durante 60 min con 0,1 ml de sustrato y 0,1 ml de infranadante. La reacción se detuvo añadiendo 3,25 ml de metanol/cloroformo/heptano (10:9:7) y 1 ml de carbonato de potasio 0,1 M, ácido bórico 0,1 M, pH 10,5. Después de centrifugar (800 g, 20 min) se determinó la radiactividad en 1 ml de la fase superior por recuento de centelleo líquido.

Efecto de un inhibidor sobre la actividad de ATGL

La figura 4 muestra el efecto del conocido inhibidor de HSL orlistat (Xenical[®] Roche) sobre la actividad de ATGL. Se utilizó un adenovirus recombinante que codificaba ATGL o HSL marcadas con His para infectar células HepG2 como se describe anteriormente. Para los ensayos de actividad, se incubaron las fracciones citosólicas de las células con un sustrato con trioleína radiomarcada en ausencia (control) o en presencia de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de orlistat. En la Fig. 4 se puede ver que la adición de orlistat redujo la actividad de ATGL en un 98 %.

Efecto de un halogenuro de metal alcalino en la actividad de HSL y ATGL

Se utilizó un adenovirus recombinante que codifica ATGL o HSL marcadas con His para infectar células HepG2. La infección produjo un aumento de entre 7 y 12 veces de la actividad de TG hidrolasa para HSL y ATGL, respectivamente, en comparación con las células infectadas con LacZ. Para ensayos de actividad, se incubaron las fracciones citosólicas de las células con un sustrato que contenía trioleína radiomarcada en ausencia (control) o en presencia de las concentraciones de sal indicadas.

Los resultados se muestran en la figura 5. La adición de KCl produjo una disminución dependiente de la dosis en la

actividad de HSL (-68 % con KCl 1 M). En contraste, la actividad de ATGL fue estimulada por KCl (+ 84 % con KCl 1 M).

Figura 6. CGI-58 activa específicamente la actividad de TGH de ATGL. Se clonaron ATGL, HSL, y CGI-58 murinas en un vector de expresión pcDNA4/HisMax con marca His y las proteínas recombinantes se expresaron temporalmente en células COS-7. Se utilizó β -galactosidasa (LacZ) como control, **(a)** se detectaron las proteínas marcadas con His en los extractos citoplasmáticos de las células transfectadas mediante bandas Western usando un anticuerpo anti-His monoclonal, **(b)** se determinó la actividad de TGH de extractos citoplasmáticos de células transfectadas utilizando un sustrato de trioleína radiomarcada, **(c)** se mezclaron los extractos citoplasmáticos de células que expresan ATGL o HSL con extractos que contienen ya sea CGI-58 o LacZ y se determinó la actividad de TGH. Se usó LacZ como control, **(d)** efecto dependiente de la dosis de CGI-58 sobre la actividad de TGH de ATGL. Se mezclaron extractos citoplasmáticos de células que expresan ATGL con concentraciones crecientes de extractos que expresan CGI-58 y se analizó la actividad de TGH. Los niveles de expresión de ATGL y CGI-58 en extractos citoplasmáticos se visualizaron mediante bandas Western utilizando un anticuerpo anti-His y se cuantificaron densitométricamente. Las proporciones molares se calcularon mediante el ajuste de la intensidad de la expresión de la proteína recombinante respectiva marcada con His, **(e)** la activación de ATGL se analizó por la unión del inhibidor de lipasas fluorescente NBD-snITG. Se incubaron extractos citoplasmáticos con inhibidor marcado con fluorescencia y se corrieron en un gel SDS-PAGE. Las proteínas marcadas con NBD-snITG se visualizaron en un BioRad FX Pro Laserscanner. Los datos de los ensayos de actividad de TGH se presentan como media \pm D.T. y representan al menos tres experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ **(f)** Efecto dependiente de la dosis de hCGI-58 sobre la actividad de TGH de hATGL. Se determinó la proporción molar ATGL/CGI-58 como se describe en **(d)**.

La Fig. 6 muestra que CGI-58 afecta el metabolismo de los lípidos como activador de ATGL y parece ser clave en el metabolismo lipídico celular. Con respecto a los altos niveles de expresión de CGI-58 y ATGL en el tejido adiposo, la modulación de la actividad de cada proteína podría afectar al metabolismo de lo TG y los AGL y por lo tanto ofrecer una estrategia para el tratamiento de la obesidad y de los trastornos relacionados.

25 Listado de referencias

1. Bergman, R.N., G.W. Van Citters, S.D. Mittelman, M.K. Dea, M. Hamilton-Wessler, S.P. Kim, and M. Ellmerer. 2001. Central role of the adipocyte in the metabolic syndrome. *J Investig Med* 49: 119-26.
2. Blaak, E.E. 2003. Fatty acid metabolism in obesity and type 2 diabetes mellitus. *Proc Nutr Soc* 62: 753-60.
3. Boden, G. and G.I. Shulman. 2002. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Eur J Clin Invest* 32 Suppl 3: 14-23.

4. Arner, P. 2002. Insulin resistance in type 2 diabetes: role of fatty acids. *Diabetes Metab Res Rev* 18 Suppl 2: S5-9.
5. Collins, S. and R.S. Surwit. 2001. The beta-adrenergic receptors and the control of adipose tissue metabolism and thermogenesis. *Recent Prog Horm Res* 56: 309-28.
6. Sztalryd, C., G. Xu, H. Dorward, J.T. Tansey, J.A. Contreras, A.R. Kimmel, and C. Londos. 2003. Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation. *J Cell Biol* 161: 1093-103.
7. Haemmerle, G., R. Zimmermann, M. Hayn, C. Theussl, G. Waeg, E. Wagner, W. Sattler, T.M. Magin, E.F. Wagner, and R. Zechner. 2002. Hormone-sensitive Lipase Deficiency in Mice Causes Diglyceride Accumulation in Adipose Tissue, Muscle, and Testis. *J Biol Chem* 277: 4806-4815.
8. Okazaki, H., J. Osuga, Y. Tamura, N. Yahagi, S. Tomita, F. Shionoiri, Y. Iizuka, K. Ohashi, K. Harada, S. Kimura, T. Gotoda, H. Shimano, N. Yamada, and S. Ishibashi. 2002. Lipolysis in the absence of hormone-sensitive lipase: evidence for a common mechanism regulating distinct lipases. *Diabetes* 51: 3368-75.
9. Wang, S.P., N. Laurin, J. Himms-Hagen, M.A. Rudnicki, E. Levy, M.F. Robert, L. Pan, L. Oligny, and G.A. Mitchell. 2001. The adipose tissue phenotype of hormone-sensitive lipase deficiency in mice. *Obes Res* 9: 119-28.
10. Zimmermann, R., G. Haemmerle, E.M. Wagner, J.G. Strauss, D. Kratky, and R. Zechner. 2003. Decreased fatty acid esterification compensates for the reduced lipolytic activity in hormone-sensitive lipase-deficient white adipose tissue. *J Lipid Res* 44: 2089-99.
11. Oskolkova, O.V., R. Saf, E. Zenzmaier, and A. Hermetter. 2003. Fluorescent organophosphonates as inhibitors of microbial lipases. *Chem Phys Lipids* 125: 103-14.
12. Yeaman, S.J., G.M. Smith, C.A. Jepson, S.L. Wood, and N. Emmison. 1994. The multifunctional role of hormone-sensitive lipase in lipid metabolism. *Adv Enzyme Regul* 34: 355-70.
13. Wei, S., K. Lai, S. Patel, R. Piantadosi, H. Shen, V. Colantuoni, F.B. Kraemer, and W.S. Blaner. 1997. Retinyl ester hydrolysis and retinol efflux from BFC-1beta adipocytes. *J Biol Chem* 272: 14159-65.

14. Fredrikson, G., P. Stralfors, N.O. Nilsson, and P. Befrage. 1981. Hormone-sensitive lipase of rat adipose tissue. Purification and some properties. *J Biol Chem* 256: 6311-20.
15. Fredrikson, G., H. Tornqvist, and P. Befrage. 1986. Hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase are both required for complete degradation of adipocyte triacylglycerol. *Biochim Biophys Acta* 876: 288-93.
16. Liu, P., Y. Ying, Y. Zhao, D.I. Mundy, M. Zhu, and R.G. Anderson. 2004. Chinese hamster ovary K2 cell lipid droplets appear to be metabolic organelles involved in membrane traffic. *J Biol Chem* 279: 3787-92.
17. Baulande, S., F. Lasnier, M. Lucas, and J. Pairault. 2001. Adiponutrin, a transmembrane protein corresponding to a novel dietary- and obesity-linked mRNA specifically expressed in the adipose lineage. *J Biol Chem* 276: 33336-44.
18. Tatusov, R.L., D.A. Natale, I.V. Garkavtsev, T.A. Tatusova, U.T. Shankavaram, B.S. Rao, B. Kiryutin, M.Y. Galperin, N.D. Fedorova, and E.V. Koonin. 2001. The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. *Nucleic Acids Res* 29: 22-8.
19. Bateman, A., L. Coin, R. Durbin, R.D. Finn, V. Hollich, S. Griffiths-Jones, A. Khanna, M. Marshall, S. Moxon, E.L. Sonnhammer, D.J. Studholme, C. Yeats, and S.R. Eddy. 2004. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* 32 Database issue: D138-41.
20. Shewry, P.R. 2003. Tuber storage proteins. *Ann Bot (Lond)* 91: 755-69.
21. Athenstaedt, K. and G. Daum. 2003. YMR313c/TGL3 encodes a novel triacylglycerol lipase located in lipid particles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 278: 23317-23.
22. Dessen, A., J. Tang, H. Schmidt, M. Stahl, J.D. Clark, J. Seehra, and W.S. Somers. 1999. Crystal structure of human cytosolic phospholipase A2 reveals a novel topology and catalytic mechanism. *Cell* 97: 349-60.
23. Rydel, T.J., J.M. Williams, E. Krieger, F. Moshiri, W.C. Stallings, S.M. Brown, J.C. Pershing, J.P. Purcell, and M.F. Alibhai. 2003. The crystal structure, mutagenesis, and activity studies reveal that patatin is a lipid acyl hydrolase with a Ser-Asp catalytic dyad. *Biochemistry* 42: 6696-708.

24. Bernlohr, D.A., M.A. Bolanowski, T.J. Kelly Jr, and M.D. Lane. 1985. Evidence for an increase in transcription of specific mRNAs during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem* 260: 5563-7.
25. Notredame, C., D.G. Higgins, and J. Heringa. 2000. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* 302: 205-17.
26. Thompson, J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D.G. Higgins. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876-82.
27. Bernlohr, D.A., M.A. Bolanowski, T.J. Kelly Jr, and M.D. Lane. 1985. Evidence for an increase in transcription of specific mRNAs during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem* 260: 5563-7.
28. Liu, P., Y. Ying, Y. Zhao, D.I. Mundy, M. Zhu, and R.G. Anderson. 2004. Chinese hamster ovary K2 oel lipid droplets appear to be metabolic organelles involved in membrane traffic. *J Biol Chem* 279: 3787-92.
29. Oskolkova, O.V., R. Saf, E. Zenzmaier, and A. Hermetter. 2003. Fluorescent organophosphonates as inhibitors of microbial lipases. *Chem Phys Lipids* 125: 103-14.
30. Holm, C. and T. Osterlund. 1999. Hormone-sensitive lipase and neutral cholesteryl ester lipase. in *Lipase and Phospholipase Protocols*, M.Doolittle, K.Reue, Eds. (Humana Press, Totowa, New Jersey) 109, chap.11.

gggctgcggc	ttcctcggcg	atgtttcc	ccgcgagaag	acgtggaaca	tctcgttcgc
goccttcctg	gtggccaacg	tctactacgt	cggcgtggcc	tcctgcctcc	gcgagcacgc
cacggcgctg	gtcaccgggg	ccacgcacat	ctacggcgcc	tcggccgggg	cgctcacgge
taaagaggcc	cggaagcggg	tctgcctggg	tgaggctggg	gccaagtcca	ttgaggtatc
catccgcagt	ttcctgctga	tcctgggccc	cctgcacccc	tccttcaacc	tggtaaagat
cctgggcate	tccttgacce	aggctcctgcc	tgctgatagc	catgagcatg	ccagtgggcg
ctccaaggac	gagctcatcc	gcgtgtcaga	cggcgagaat	gtcattatat	cccacttcaa
gctcatccct	cctccctccc	aggccaatgt	ctgcagcggg	ttcatccccg	tgtactgtgg
gccactctat	gagcttaaga	aggggggtgcg	ctacgtggat	ggtggcattt	cagacaacct
ctgtccgcag	gacagctcca	acaccatcac	agtgtcccc	ttctcggggcg	agagtgcacat
gttcaaoctg	cgcaacctct	ccaacatcca	cgagctgcgg	gtcaccaaca	ccagcatcca
gctgcgagag	atgtgcaagc	accgcctctc	caaggccctc	ttcccggcgg	agcccctggt
cctcctgaac	cggcccaacc	agggataccg	ggatggcctg	cgctttctgc	agcggaacgg
ggacaaggac	caggcagtgg	ccttgctggc	ggtgcccccc	gcccggcccc	acggcccaga
agatcacatc	ctggagcacc	agagcgcccc	agcggaggat	tactcgcagc	tgccgggaga
ggagcccacg	gacctgctga	tgcccggccc	gctcaatgag	gccctgctgg	aggcctgctg
catgatgggtg	ccctacaacg	ccaccctctc	caacatgctg	cctgtgcgtc	tggccacggc
ggagtggctg	cccgaacttc	tgccgctgga	gagcgetctg	tccttcacca	tcogcttgct
ctgccagtac	ctggtgatgc	ccgaggacat	coggtggatg	aaggagcaga	cgggcagcat
gccggagcag	gtggagctgc	gcgccaagag	gaagctgggc	aggcacctgc	cctccagget
cgctacaga	gaggcaactgc	gccgcgtcca	gtcgtgcccg	tcogtgcccg	tgtcctgccc
ggccaagtgg	gaggagtgcc	ccggetggat	gcgcaacaac	ctctcgtctg	gggacgcgct
cttcccggccc	gaagctctgc	agcgccagct	gctgctcggc	ctcttctgca	ccaacgtggc
cccagcatcc	ccgcagcacc	gcatgcgcgc	acccgcccgc	ccggtcccgc	cccccgcgga
cgaggcccgg	cccgtgatcg	agctggcccgg	gctgcccccc	ttgctgagca	cccctgctcc
		gggcctcggg	gctgtga		

SEQ No. 1

ttcccgaggg	agaccaagtg	gaacatctca	ttcgetggct	gcgggttcc	atg
cacattggcg	tggcctectg	ctcctcgtgag	caecgcgcct	tcctggtgga	cggggtctac
cacatctacg	gagcctcggc	aggggcctc	accgcctcag	cgctggtcac	caacgcact
ctgggtgaag	caggtgccaa	cattattgag	gtgtccaagg	aggcccgga	tggggcctgc
ggctctctgc	ctcctcctt	caactgtgtg	aagaccatcc	gtggctgtct	gcggttctg
ctgctgtctg	altgccatga	ggcgcccaat	ggacgcctgg	gcctctcct	actaagacc
tcagaeggag	agaactcat	catatcccac	tttagctcca	aggatgagct	gactcgtgt
aatgtctgoa	gcacatttat	cccggtgtac	tgtggcctca	ttcctcctac	catocaggcc
gtgcctatg	tggatgggg	cahttcagac	aacttgcac	tttatgagct	cctccaaggg
atcacagtgt	ccccattctc	agggagagt	gacatctgcc	ctcaggacag	gaagaatacc
atccacgagc	ttcgcgtcac	caacaccagc	atccagtcca	accttcgcaa	ctccaccaac
ctctcgaagg	ctctcttccc	gccagagccc	atggctctcc	gagagatgtg	tctctaccgc
tcagagatg	gacttcgatt	ctttaggagg	aatggcctac	lgaaccaacc	caaccctttg
ctggcactgc	ccccagttgt	ccccagga	gaggatgcag	aggaagetgc	tgtgggtggg
gagagggctg	gagaggagga	tcacttgcag	ccttatagaa	agatcgaat	tctagagcac
ctgctgcca	gactcaatga	ggcctctgtg	gaggectgtg	tggaaacaaa	ggacctgatg
accaccttt	ccaacatgct	accagtgcgc	ctggaaccgg	ccatgatggt	gccccatact
ctgcccctgg	agagtgcagt	ctccttcacc	ctcgccttgt	tggagtggct	gctgatgtc
cctgaagata	tccggtggat	gacagagcag	acgggtagca	tctgccagta	tctgggtgatg
agggccaaga	ggaaathggg	tgaccatctg	ccttcacagac	tgtctgagca	ggtggaactg
cgactgccc	agtctctgoc	ctctgtgcca	ctgtcttggg	ccacctacag	tgaggcccta
cccaactggg	tcgaaacaa	cctctcactg	ggggacgcgc	tggccaagtg	ggaagaatgc
cagcgtcagc	tactgctggg	tctctctctg	accaatgtgg	ccttcccgcc	ggatgccttg
cgatgcggc	caactgcag	ccccactgcc	gcagatctg	ccaccacaca	ggatccagct
ggctccccg	cttgtctga				

SEQ No. 2

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para determinar la actividad triglicérido hidrolasa de una proteína que comprende una cadena polipeptídica codificada por la secuencia de ADN de acuerdo con la SEQ NO. 1 en una muestra acuosa en presencia de lipasa sensible a hormonas, caracterizado por que se añade halogenuro de metal alcalino a la muestra en una cantidad eficaz para suprimir la actividad de dicha lipasa sensible a hormonas, después de lo que se determina la actividad triglicérido hidrolasa.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que dicho halogenuro de metal alcalino es cloruro de potasio.
3. Uso de CGI-58 (identificación de genes comparativa 58) como activador de una proteína que comprende una cadena polipeptídica codificada por la secuencia de ADN de acuerdo con la SEQ NO. 1 *in vitro*.
4. Anticuerpo como inhibidor de la actividad de triglicérido lipasa adiposa codificada por una secuencia de ADN que comprende la secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 para su uso en el tratamiento de la obesidad, la diabetes de tipo 2 o el síndrome metabólico.

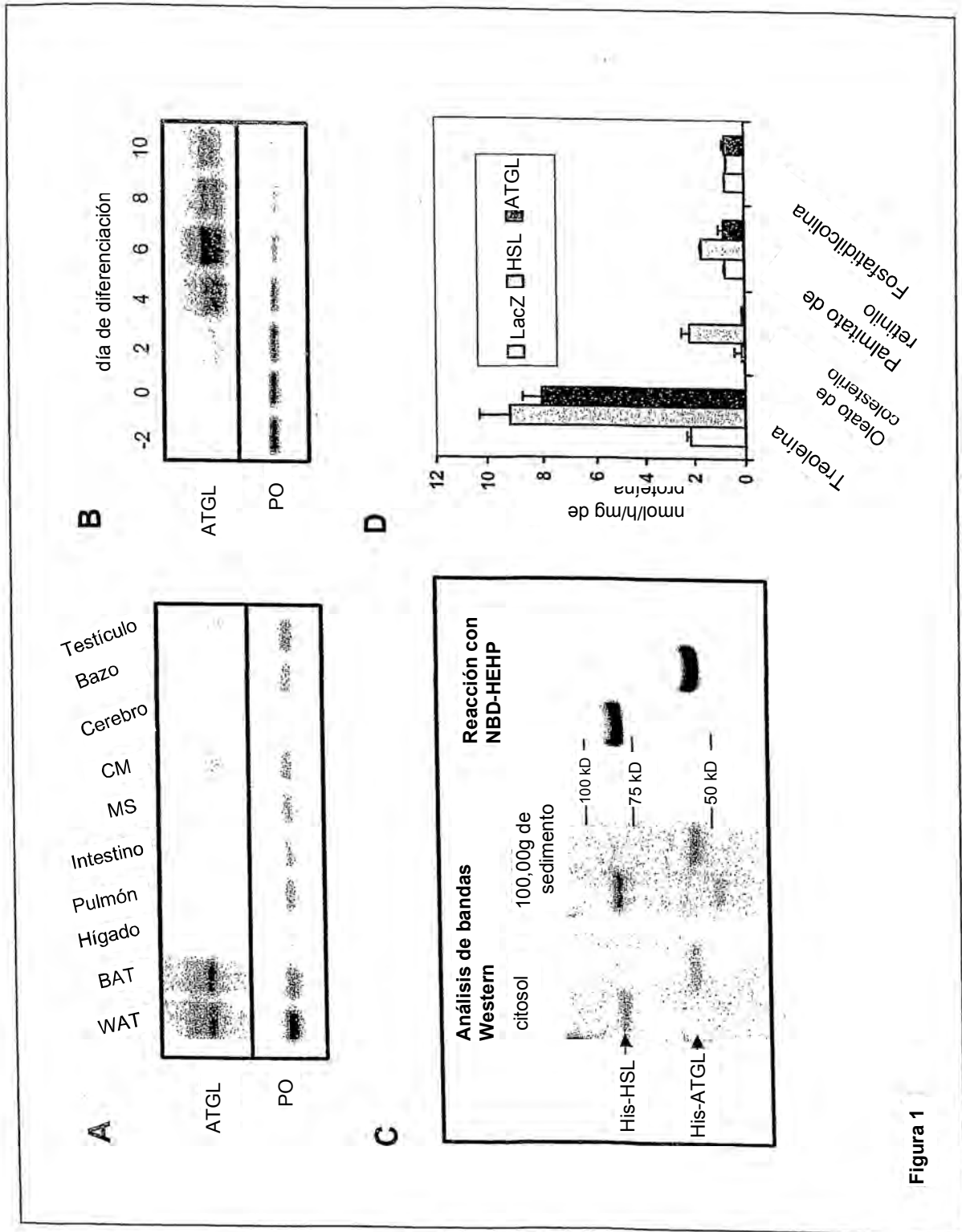


Figura 1

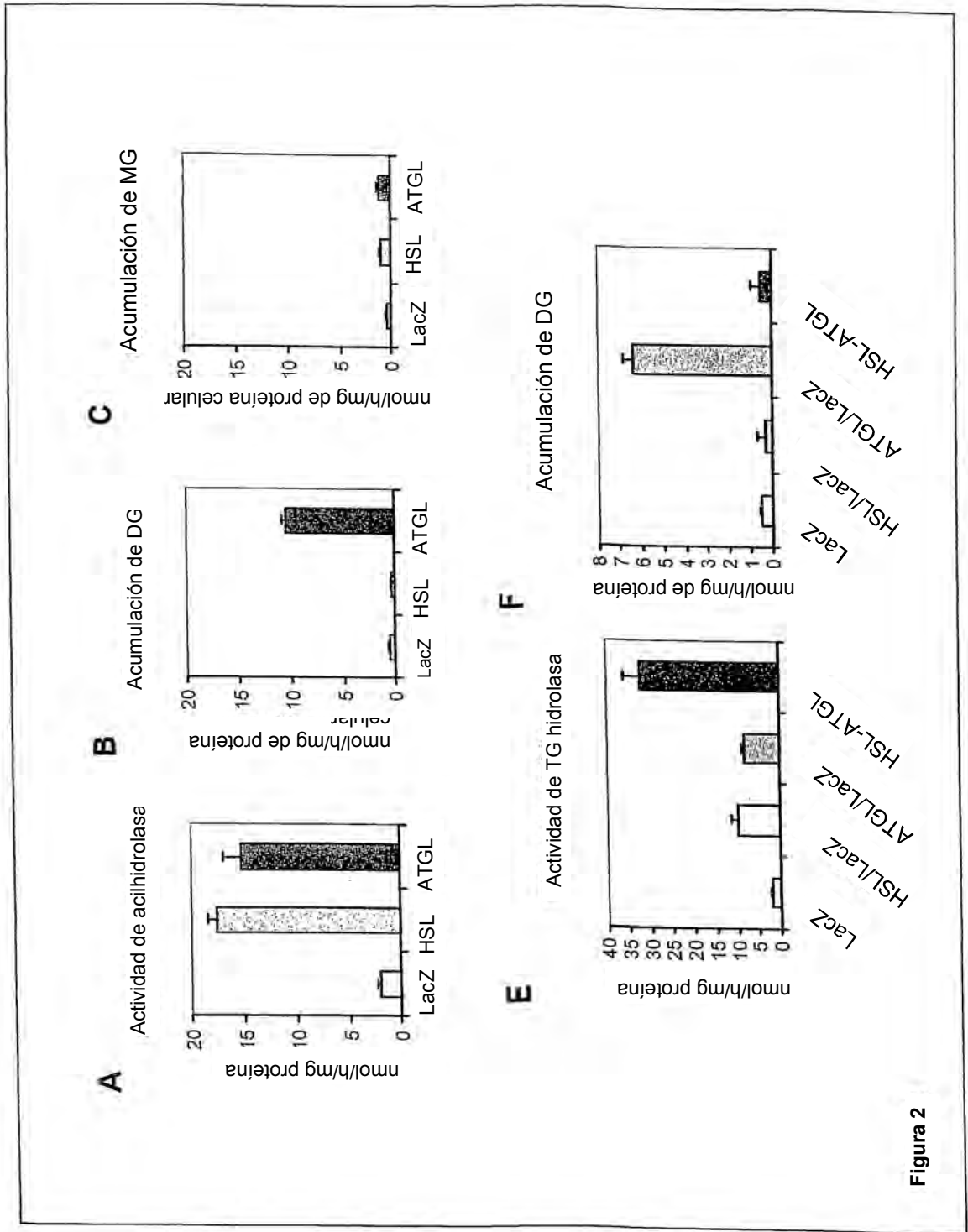


Figura 2

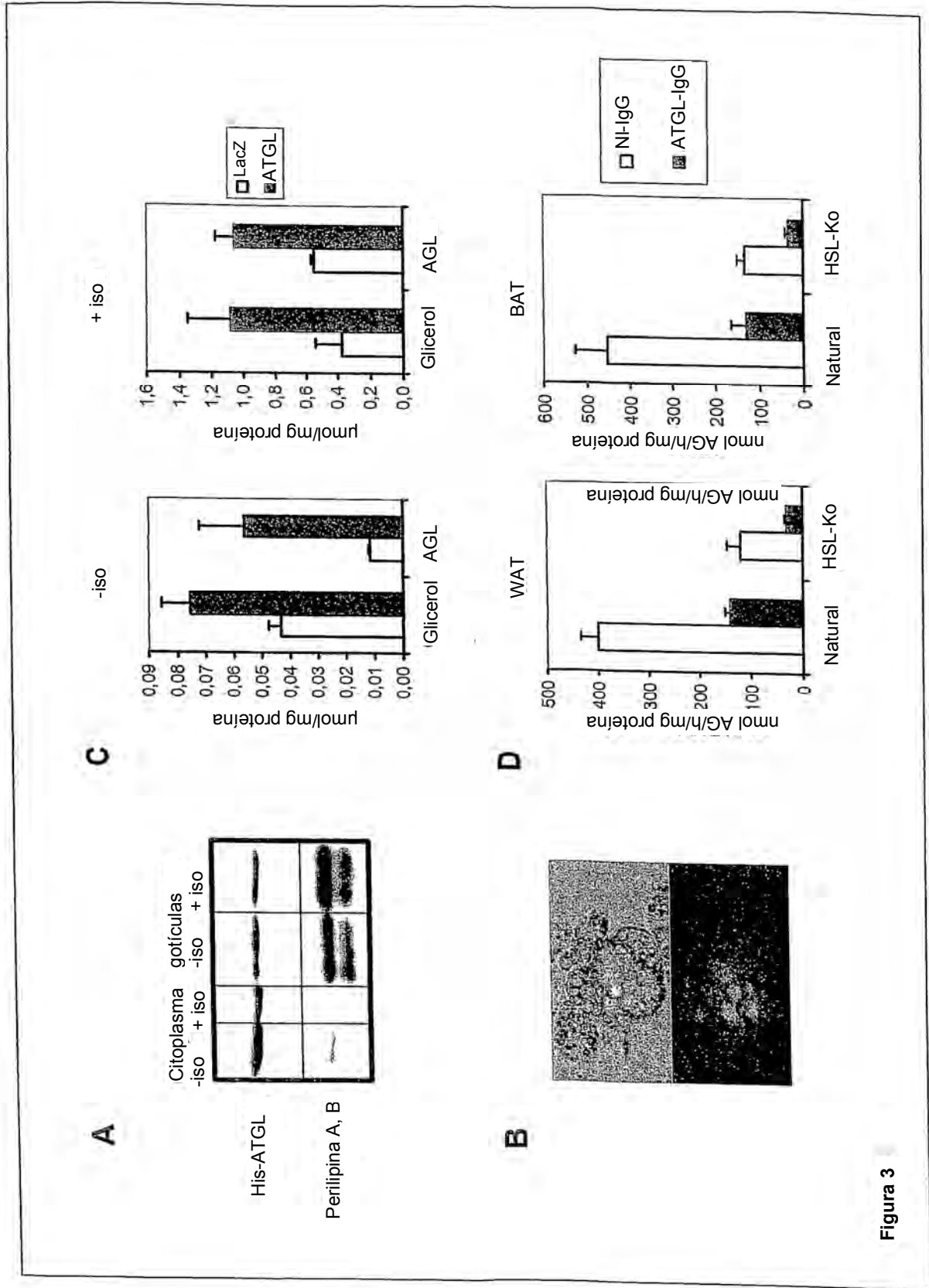


Figura 3

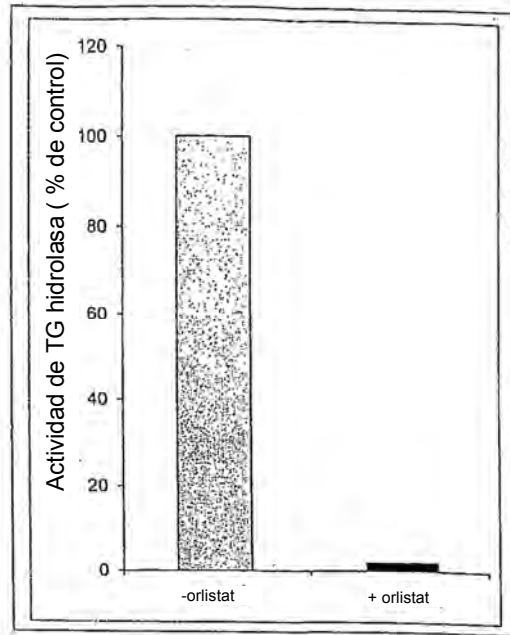


FIG. 4

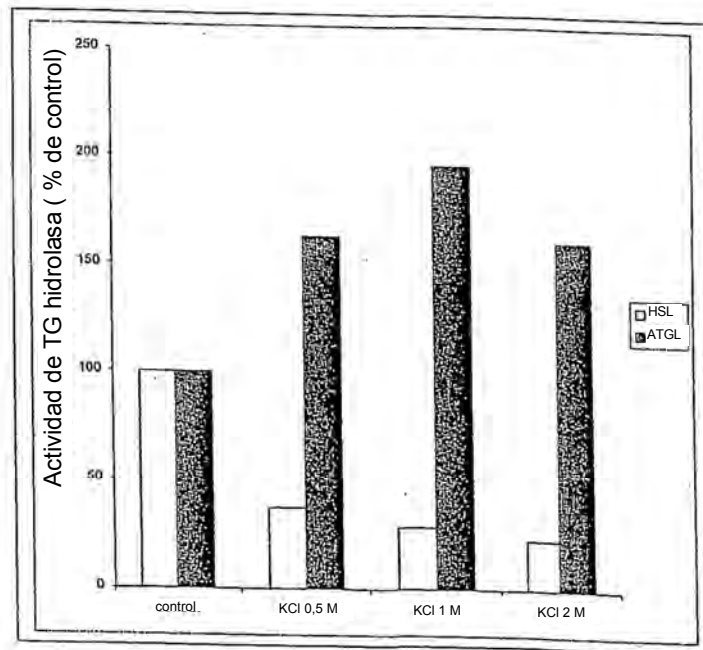


FIG. 5

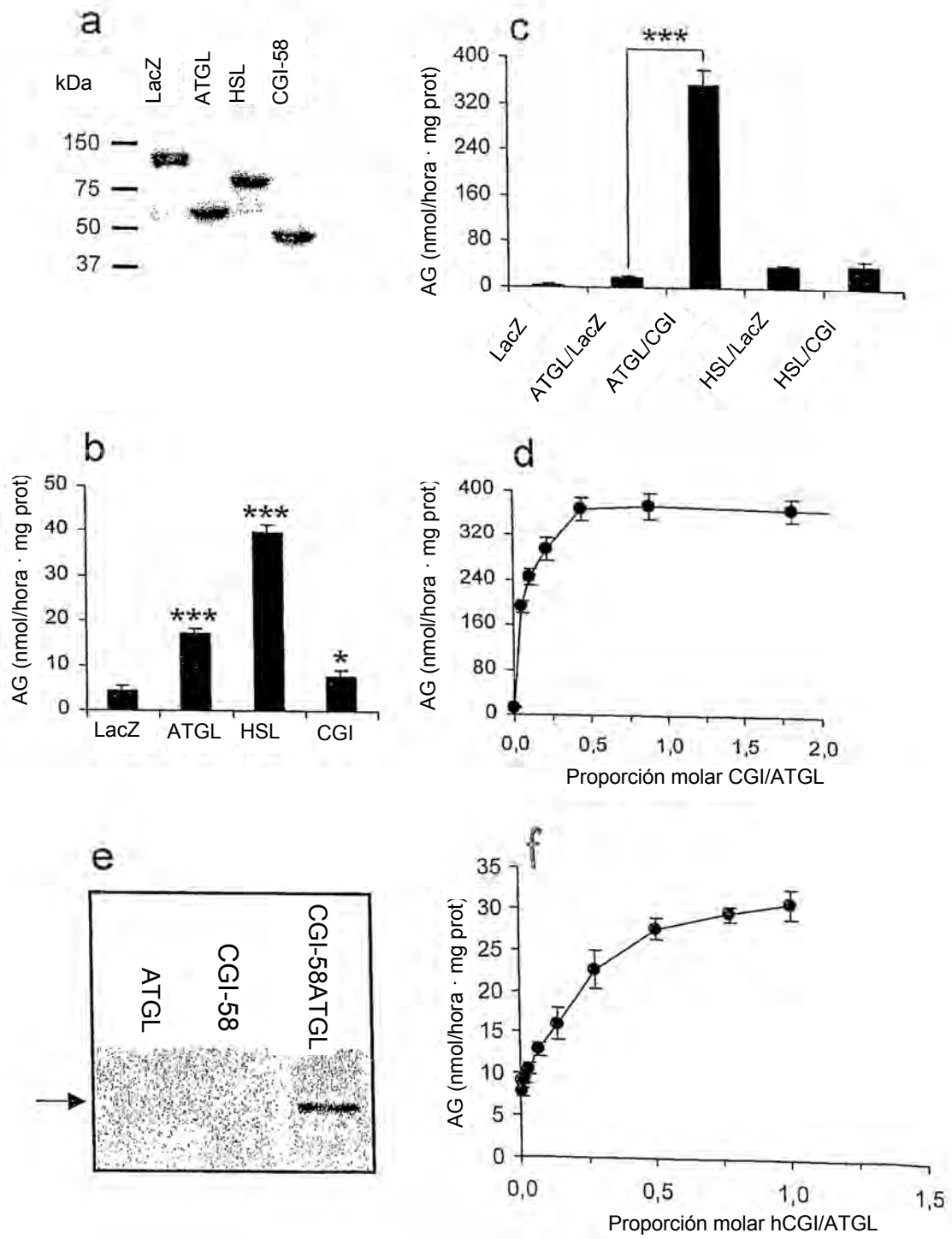


Figura 6