

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR,  
FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA**

Programa de Doctorado en Biomedicina



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS MARCADORES  
REGULADORES DEL FUNCIONAMIENTO  
DEL TEJIDO ADIPOSEO**

**Andrés Ricardo Trávez García**

**Córdoba, 2016**

TITULO: *CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS MARCADORES REGULADORES  
DEL FUNCIONAMIENTO DEL TEJIDO ADIPOSO*

AUTOR: *Andrés Ricardo Trávez García*

---

© Edita: UCOPress. 2017  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

[www.uco.es/publicaciones](http://www.uco.es/publicaciones)  
[publicaciones@uco.es](mailto:publicaciones@uco.es)

---



# DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA

Programa de Doctorado de Biomedicina



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

## CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS MARCADORES REGULADORES DEL FUNCIONAMIENTO DEL TEJIDO ADIPOSO

Memoria de la Tesis Doctoral presentada por **Andrés Ricardo Trávez García**,  
Licenciado en Biotecnología, para optar al grado de **Doctor en Ciencias**.

Los Directores

**Dra. María del Mar Malagón**

Catedrática de Biología Celular de la  
Universidad de Córdoba

**Dr. Rafael Vázquez Martínez**

Profesor Titular de Biología Celular de  
la Universidad de Córdoba

En Córdoba, a 14 de noviembre de 2016





UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**DPTO. DE BIOLOGÍA CELULAR,  
FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA**



**D<sup>a</sup> María del Mar Malagón Poyato** (Catedrática de Biología Celular), y **D. Rafael Vázquez Martínez** (Profesor Titular de Biología Celular), ambos pertenecientes al Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba,

#### **INFORMAN**

Que D. **ANDRÉS RICARDO TRÁVEZ GARCÍA**, Licenciado en Biotecnología, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo titulado **“CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS MARCADORES REGULADORES DEL FUNCIONAMIENTO DEL TEJIDO ADIPOSEO”**, que, bajo nuestro juicio, reúne los méritos suficientes para optar al Grado de Doctor en Ciencias.

Y para que conste, firmamos el presente documento en Córdoba, 14 de noviembre de 2016.

Firma del/de los director/es

Fdo.: Prof. **Dra. María del Mar Malagón**

Fdo.: Prof. **Dr. Rafael Vázquez Martínez**





**TÍTULO DE LA TESIS:**

Caracterización de nuevos marcadores reguladores del funcionamiento del tejido adiposo

**DOCTORANDO/A:**

Andrés Ricardo Trávez García

**INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS**

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

Durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, en el periodo comprendido entre octubre de 2011 y noviembre de 2016, el Doctorando Andrés Ricardo Trávez García ha superado los objetivos científicos y formativos planteados al comienzo de la misma, habiendo ampliado éstos además mediante la puesta a punto e implementación de nuevas aproximaciones metodológicas que le han permitido afrontar preguntas conceptuales adicionales y ampliar su campo de conocimiento. Los trabajos realizados se han preparado en forma de un artículo científico que está sometido para su publicación, y han dado lugar igualmente a varias comunicaciones, orales y de tipo póster, a jornadas, congresos nacionales e internacionales, algunas de las cuales han recibido premios. Concretamente, el Doctorando ha presentado 4 comunicaciones tipo Póster y 1 comunicación oral en congresos de ámbito nacional, de las que dos de ellas recibieron el premio a la Mejor Comunicación, y 1 comunicación tipo póster en un congreso internacional. Además, Andrés ha participado en un trabajo relacionado metodológica y conceptualmente con su Tesis Doctoral, sobre una de las proteínas caracterizadas en la presente Tesis, que ha sido publicado en las revista PLoS One.

Por todo ello, se solicita la autorización para la presentación de la Tesis Doctoral.

Córdoba, 14 de noviembre de 2016

Firma del/de los director/es

Fdo.: Prof. **Dra. María del Mar Malagón**

Fdo.: Prof. **Dr. Rafael Vázquez Martínez**





Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba, bajo la dirección de los Dres. María del Mar Malagón Poyato y Rafael Vázquez Martínez. haEl proyecto sido subvencionado mediante una beca del Programa Nacional de becas FPI (BES-2011-046017) concedida por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad.



# ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS



aa	Amino ácidos
AC	Adenilato ciclasa
ACS	Acil-CoA sintasa
ACSL	Acil-CoA sintetasa de cadena larga
ADRP	Proteína relacionada con la diferenciación de adipocitos
AGPAT	sn-1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferasa
AMP	5' -adenosina monofosfato
AMPC	5' -adenosina monofosfato cíclico
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
Arf	<i>ADP-rybosition factor</i>
ATGL	Lipasa de triglicéridos de tejido adiposo
ATP	5'-adenocina trifosfato
C/EBP $\alpha$	<i>CCAAT-enhancer-binding proteins alpha</i>
C/EBP $\beta$	<i>CCAAT-enhancer-binding proteins beta</i>
C/EBP $\delta$	<i>CCAAT-enhancer-binding proteins delta</i>
CAV	Caveolina
CBD	<i>Caveolin-binding domain</i>
CCT	CTP:fosfocolina citidiltransferasa
CGN	red <i>cis</i> del Golgi ( <i>cis-Golgi Network</i> )
CMM	Células madre mesenquimales
CoA	Coenzima A
COPI/II	<i>Coat protein I/II</i>
CRAC	<i>Cholesterol Recognition/interaction Amino acid Consensus</i>
CSD	<i>Caveolin scaffolding domain</i>
DAG	Diglicéridos
DGAT2	Diacilglicerol aciltransferasa-2
DHAP	Dihidroxiacetona-3-fosfato
EEA1	Antígeno 1 de endosomas tempranos
ERGIC	Compartimento intermedio entre aparato de Golgi y Retículo endoplásmico
FA	Ácido graso
FAS	<i>Fatty acid synthase</i>
FEV	Fracción del estroma vascular
FFA	Ácidos grasos libres
G3P	Glicerol-3-fosfato
GAP	<i>GTPase-activating protein</i>
GDI	<i>GDP Dissociation Inhibitor</i>
GDP	Guanosín difosfato
GEF	<i>Guanine exchange factor</i>
GK	Gliceroquinasa
GL	Gota lipídica
GPAT	Glicerol-3-fosfato aciltransferasa

GTP	Guanosín trifosfato
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HSL	Lipasa sensible a hormonas
IL-6	Interleuquina-6
IR	Receptor de Insulina
IRS	Sustratos del receptor de insulina
KO	Knockout
LPL	Lipoproteína lipasa
MAG	Monoacilglicerol
MAM	<i>Mitochondria-associated membranes</i>
MAPK	<i>Mitogen activated p38 kinase</i>
MGL	Lipasa de monoglicéridos
MEC	Matriz extracelular
mTORC1	<i>mTOR-Raptor complex</i>
NAFLD	Enfermedad de hígado graso no-alcohólico
NECC	<i>Neuroendocrinal Long Coiled-coil</i>
NGF	Factor de crecimiento neuronal
PA	Ácido fosfatídico
PAP	Ácido fosfatídico fosfatasa
PC	Fosfatidilcolina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDE	Fosfodiesterasa
PE	Fosfatidiletanolamina
PEMT	Fosfatidiletanolamina metil transferansa
PEST	<i>Proline, glutamic acid, serine and threoninerich domain</i>
PH	Dominio de tipo pleckstrina
PI	Fosfatidilinositol
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinasa
PIP2	Fosfatidilinositol di-fosfato
PKA	Proteína quinasa A
PKB	Proteína quinasa B
PKC	Proteína quinasa C
PLIN	Perilipina
PPAR $\gamma$	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
PS	Fosfatidilserina
PTB	Fosfotirosina de unión
RE	Retículo endoplásmico
RILP	Proteína Rab de interacción con lisosoma
SH2	<i>Src homology 2</i>
siRNA	Acido ribonucleico interferente pequeño
SNARE	<i>Soluble N-ethyl maleimide sensitive factor attachment protein receptor</i>
T2D	Diabetes tipo 2
TA	Tejido adiposo
TAB	Tejido adiposo blanco
TAG	Triglicérido
TAM	Tejido adiposo marrón
TASC	Tejido adiposo subcutáneo

TAV	Tejido adiposo visceral
TGN	Red <i>trans</i> del Golgi ( <i>tras-Golgi Network</i> )
TMD	<i>Trans-membrane domain</i>
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
TRK	<i>Tropomyosin-related kinase receptors</i>
Tyr	Tirosina
u.a.	Unidades arbitrarias





# ÍNDICE



# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>9</b>
<b>1.1. Tejido adiposo</b> .....	<b>11</b>
1.1.1. Tipos de tejido adiposo.....	12
1.1.2. Adipogénesis y componentes celulares del tejido adiposo .....	14
1.1.2.1. <i>Adipogénesis</i> .....	14
1.1.2.2. <i>Componentes del tejido adiposo</i> .....	16
1.1.2.2.1. <i>Adipocitos</i> .....	16
1.1.2.2.2. <i>La membrana del adipocito</i> .....	17
<b>1.2. Caveolas</b> .....	<b>18</b>
1.2.1. Familia de cavinas.....	21
1.2.2. Otros componentes de las caveolas.....	22
1.2.3. Funciones de las caveolas.....	23
<b>1.3. Regulación del metabolismo en adipocitos</b> .....	<b>26</b>
<b>1.4. Insulina</b> .....	<b>27</b>
<b>1.5. Lipogénesis <i>de novo</i></b> .....	<b>30</b>
<b>1.6. Lipolisis</b> .....	<b>31</b>
<b>1.7. Gotas lipídicas</b> .....	<b>32</b>
1.7.1. Relación de las gotas lipídicas con otros orgánulos celulares.....	34
1.7.1.1. <i>Retículo endoplasmático</i> .....	34
1.7.1.2. <i>Mitocondrias</i> .....	37
1.7.1.3. <i>Peroxisomas</i> .....	38
1.7.1.4. <i>Endosomas</i> .....	39
1.7.1.5. <i>Aparato de Golgi</i> .....	41
<b>1.8. Tráfico intracelular</b> .....	<b>43</b>
<b>1.9. Factores de <i>tethering</i></b> .....	<b>44</b>
1.9.1. Familia de proteínas <i>long coiled-coil</i> ; NECC1/NECC2/Jakmip1-Marlin1 .....	47
<b>1.10. Proteínas Rab GTPasas</b> .....	<b>49</b>
1.10.1. Rab34 .....	56

<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>59</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>63</b>
<b>3.1. Material biológico .....</b>	<b>65</b>
3.1.1. Cultivos de líneas celulares.....	65
3.1.2. Obtención de muestras de tejido adiposo humano.....	66
3.1.2.1. <i>Dispersión de tejido adiposo y obtención de adipocitos maduros y fracción de estroma vascular .....</i>	<i>69</i>
<b>3.2. Transfección y electroporación de cultivos celulares .....</b>	<b>71</b>
3.2.1. Vectores de expresión y silenciamientos y siRNAs utilizados .....	71
3.2.2. Transfección transitoria de líneas celulares .....	72
3.2.3. Electroporación de células 3T3-L1.....	73
<b>3.3. Localización intracelular de NECC2 .....</b>	<b>73</b>
3.3.1. Estudios de localización intracelular por inmunocitoquímica.....	73
3.3.2. Estudios de la distribución de NECC2 mediante fraccionamiento subcelular .....	75
3.3.2.1. <i>Fraccionamiento de caveolas.....</i>	<i>75</i>
3.3.2.2. <i>Aislamiento de fracciones citosólica y de membrana de los adipocitos..</i>	<i>76</i>
<b>3.4. Localización intracelular de Rab34.....</b>	<b>77</b>
3.4.1. Estudios de localización intracelular por inmunocitoquímica.....	77
<b>3.5. Estudios funcionales .....</b>	<b>78</b>
3.5.1. Análisis del papel de NECC2 sobre la señalización mediada por insulina en adipocitos .....	78
3.5.2. Modelos celulares de obesidad para el análisis de la expresión de NECC2.....	79
3.5.3. Estudios del efecto de la sobreexpresión de Rab34 sobre la organización estructural y funcional del aparato de Golgi .....	79
3.5.4. Estudio de la acción de Rab34 en el proceso de adipogénesis .....	80
3.5.4.1. <i>Determinación de la actividad lipogénica de células 3T3-L1 .....</i>	<i>81</i>
3.5.4.2. <i>Determinación de la actividad lipolítica de células 3T3-L1 .....</i>	<i>82</i>
3.5.5. Estudio del efecto de la expresión de Rab34 en el metabolismo lipídico en adipocitos .....	83
3.5.6. Identificación de proteínas interactoras de Rab34 .....	84
<b>3.6. Métodos de análisis de muestras .....</b>	<b>85</b>
3.6.1. Extracción de ARN y cuantificación de ARNm por qRT-PCR.....	85
3.6.2. Análisis de proteínas.....	86
3.6.2.1. <i>Obtención de extractos proteicos .....</i>	<i>88</i>
3.6.2.2. <i>Precipitación de proteínas .....</i>	<i>89</i>

3.6.3. Electroforesis desnaturalizante y electrotransferencia .....	89
3.6.4. Inmunodetección y análisis densitométrico.....	89
<b>3.7. Estudios de microscopía confocal .....</b>	<b>91</b>
<b>3.8. Estudios de videomicroscopía .....</b>	<b>92</b>
<b>3.9. Análisis estadístico .....</b>	<b>92</b>
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>95</b>
<b>4.1. Caracterización molecular de la proteínas NECC2 .....</b>	<b>97</b>
4.1.1. Expresión y distribución de NECC2 durante a diferenciación de las células 3T3-L1 .....	97
4.1.2. Asociación de NECC2 a caveolas en adipocitos 3T3-L1 .....	99
4.1.3. La insulina regula la distribución de NECC2 en adipocitos 3T3-L1 .....	103
4.1.4. NECC2 regula la señalización de insulina en adipocitos.....	105
4.1.5. La expresión de NEcC2 en el tejido adiposo está modulada en respuesta a obesidad y transtornos metabólicos .....	109
<b>4.2. Caracterización molecular de la proteínas Rab34 .....</b>	<b>111</b>
4.2.1. Expresión y localización de Rab34 durante el proceso de diferenciación .	111
4.2.2. Rab34 cambia su localización en adipocitos diferenciados respecto a pre-adipocitos .....	112
4.2.3. Efecto de la sobreexpresión de Rab34 sobre el aparato de Golgi .....	117
4.2.4. Rab34 está implicada en la formación de gotas lipídicas.....	118
4.2.4.1. <i>Efecto de la sobreexpresión de Rab34 sobre la lipogénesis .....</i>	<i>119</i>
4.2.4.2. <i>Monitorización de la dinámica intracelular de Rab34 mediante videomicroscopía .....</i>	<i>121</i>
4.2.4.3. <i>Efecto de Rab34 en etapas avanzadas de la diferenciación de los adipocitos .....</i>	<i>122</i>
<b>4.3. Estudio de sobreexpresión de Rab34 .....</b>	<b>124</b>
4.3.1. Estudio de la sobreexpresión de Rab34 sobre marcadores del metabolismo lipídico .....	124
<b>4.4. Efecto del silenciamiento de Rab34 en célula 3T3-L1 .....</b>	<b>127</b>
<b>4.5. Estudio de la distribución de Rab34 en la línea celular de hepatocarcinoma HepG2128</b>	
4.5.1. Aislamiento e identificación de proteínas interactiras de Rab34 relacionadas con los procesos de lipogénesis y tráfico intracelular de membranas.....	131
<b>4.6. Rab34 en tejido adiposo humano.....</b>	<b>134</b>
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>143</b>

5.1. NECC2 es una proteína asociada a caveolas involucrada en la señalización de la insulina .....	145
5.2. Regulación de NECC2 en respuesta a estímulos obesigénicos y en resistencia a insulina .....	149
5.3. Rab34 es un componente de la cubierta de las GLs .....	150
5.4. Regulación de Rab34 en respuesta a estímulos obesigénicos y en resistencia a insulina .....	157
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>161</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>165</b>







# ÍNDICE DE FIGURAS



## ÍNDICE DE FIGURAS

### INTRODUCCIÓN

<b>Figura 1.</b>	Adipogénesis. Proceso temporal y factores implicados en la diferenciación de los adipocitos .....	15
<b>Figura 2.</b>	Estructura de las caveolas .....	19
<b>Figura 3.</b>	Entrada de ácidos grasos a través de su unión a CD36 en caveolas .....	24
<b>Figura 4.</b>	Esquema de los procesos de lipogénesis y lipólisis. ....	26
<b>Figura 5.</b>	Señalización intracelular de la insulina.....	28
<b>Figura 6.</b>	Regulación nutricional y hormonal de la síntesis <i>de novo</i> .de ácidos grasos en tejido adiposo e hígado .....	30
<b>Figura 7.</b>	Formación de GLs a partir de zonas especializadas del RE.....	35
<b>Figura 8.</b>	Mecanismos por los cuales las proteínas pueden alcanzar la superficie de las GLs o membranas adyacentes.....	37
<b>Figura 9.</b>	Esquema de interacción de GLs con varios orgánulos .....	40
<b>Figura 10.</b>	Tráfico vesicular .....	43
<b>Figura 11.</b>	Estructura dimérica paralela <i>coiled-coil</i> . ....	45
<b>Figura 12.</b>	Funciones de las proteínas con largos dominios <i>coiled-coil</i> .....	46
<b>Figura 13.</b>	Análisis de dominios y motivos estructurales de la proteína NECC2 de rata .....	48
<b>Figura 14.</b>	Distribución celular de las proteínas Rab .....	51
<b>Figura 15.</b>	Ciclo de activación de las Rab GTPasas .....	52

### MATERIALES Y MÉTODOS

<b>Figura 16.</b>	Reacciones que se llevan a cabo durante la cuantificación de TAGs en las muestras .....	80
<b>Figura 17.</b>	Reacciones que se llevan a cabo para la cuantificación de glicerol libre en el medio .....	81

### RESULTADOS

<b>Figura 18.</b> Niveles de expresión de ARNm de <i>Necc2</i> en células 3T3-L1 durante el proceso de diferenciación .....	96
<b>Figura 19.</b> Análisis de especificidad de los anticuerpos anti-NECC2 .....	97
<b>Figura 20.</b> Análisis de expresión y localización de NECC2 en las células 3T3.L1 durante el proceso de diferenciación .....	98
<b>Figura 21.</b> Estudio de localización de NECC2 en caveolas .....	100
<b>Figura 22.</b> Análisis de la asociación de NECC2 a caveolas y distribución subcelular ..	102
<b>Figura 23.</b> Regulación de la distribución de NECC2 en adipocitos 3T3-L1 en respuesta al tratamiento con insulina.....	103
<b>Figura 24.</b> Estudio de sobreexpresión de NECC2 en células 3T3-L1 a día 6 de diferenciación .....	104
<b>Figura 25.</b> Estudio del efecto de la sobreexpresión de NECC2 sobre la señalización de insulina .....	106
<b>Figura 26.</b> Estudio del efecto del silenciamiento de NECC2 en la ruta de señalización de insulina .....	107
<b>Figura 27.</b> Niveles de expresión de NECC2 en tejido adiposo humano en relación con obesidad y resistencia a insulina .....	108
<b>Figura 28.</b> Expresión de NECC2 en modelos celulares de obesidad y resistencia a insulina en adipocitos 3T3-L1 .....	109
<b>Figura 29.</b> Análisis de expresión y localización de Rab34 en células 3T3-L1 durante el proceso de diferenciación .....	111
<b>Figura 30.</b> Análisis de redistribución de Rab34 durante el proceso de diferenciación en células 3T3-L1 .....	112
<b>Figura 31.</b> Estudio de colocalización de Rab34 con orgánulos celulares durante el proceso de diferenciación de células 3T3-L1 .....	114
<b>Figura 32.</b> Estudio de la distribución de Rab34 en sobreexpresión .....	115
<b>Figura 33.</b> Análisis del efecto de la sobreexpresión de Rab34 sobre la estructura del aparato de Golgi. ....	117
<b>Figura 34.</b> Análisis del efecto de la sobreexpresión de Rab34 en la adipogénesis .....	118
<b>Figura 35.</b> Análisis del efecto del silenciamiento de Rab34 en la adipogénesis .....	119
<b>Figura 36.</b> Videomicroscopía en tiempo real en células 3T3-L1 transfectadas con GFP-Rab34 a día 3 de diferenciación tras estímulo con ácido oleico e insulina.....	121

<b>Figura 37.</b> Efecto de la sobreexpresión de GFP-Rab34 en la actividad lipogénica y lipolítica de adipocitos .....	122
<b>Figura 38.</b> Efecto del silenciamiento de la proteína Rab34 en la actividad lipogénica y lipolítica de adipocitos 3T3-L1 .....	122
<b>Figura 39.</b> Análisis de la localización de la lipasa sensible a hormonas .....	123
<b>Figura 40.</b> Imágenes de microscopía confocal de células 3T3-L1 a día 5 de cultivo que sobreexpresan GFP o GFP-Rab34 e inmunomarcadas para HSL, en condiciones control y bajo tratamiento con isoproterenol .....	124
<b>Figura 41.</b> Estudio de cuantificación de la colocalización de HSK con GFP o GFP-Rab34 en células 3T3-L1 transfectadas a día 3, tratadas con ácido oleico y expuestas a isoproterenol .....	125
<b>Figura 42.</b> Estudio de GLs en células 3T3-L1 sobreexpresando GFP o GFP-Rab34, tratadas con ácido oleico en respuesta a tratamientos con isoproterenol .....	125
<b>Figura 43.</b> Efecto del silenciamiento de Rab34 en la expresión de proteínas clave del aparato de Golgi y las GLs. ....	127
<b>Figura 44.</b> Distribución de Rab34 en células HepG2 .....	129
<b>Figura 45.</b> Diagrama representando el número de proteínas identificadas en cada una de las condiciones experimentales y las comunes en cada posible combinación de condiciones .....	131
<b>Figura 46.</b> Distribución de Rab34 durante la diferenciación <i>in vitro</i> de preadipocitos humanos .....	134
<b>Figura 47.</b> Localización de Rab34 en adipocitos humanos maduros del tejido adiposo omental y subcutáneo .....	135
<b>Figura 48.</b> Análisis de expresión de Rab34 en tejido adiposo humano.....	137
<b>Figura 49.</b> Células 3T3-L1 expuestas a ácido oleico .....	138
<b>Figura 50.</b> Expresión de Rab34 en modelos celulares de obesidad y resistencia a insulina en adipocitos 3T3-L1 .....	139



# RESUMEN





## INTRODUCCIÓN

El tejido adiposo blanco constituye un depósito de energía altamente dinámico, que almacena el exceso de energía en períodos de balance energético positivo y los moviliza en períodos de demanda energética (Ducharme y Bickel, 2008). Concretamente, el tejido adiposo almacena los ácidos grasos procedentes de la dieta en forma de triglicéridos (TAGs) (i.e., lipogénesis) en las gotas lipídicas (GLs) que ocupan la mayor parte del citosol de los adipocitos (Walther y Farese, 2012; Rodríguez *et al.*, 2015). Los TAGs son posteriormente hidrolizados (lipólisis) en ácidos grasos y glicerol, que son transportados hasta otros tejidos en donde son utilizados como fuente de energía (Guilherme *et al.*, 2008). Los procesos de almacenamiento y movilización de energía en los adipocitos están controlados por un complejo sistema multifactorial, en el que juegan un papel fundamental la insulina y las catecolaminas, respectivamente (Czech *et al.*, 2013; Malagón *et al.*, 2013). Además de su papel en la homeostasis lipídica, el tejido adiposo constituye un lugar esencial de utilización de la glucosa (revisado en Malagón *et al.*, 2013). Finalmente, el tejido adiposo es un importante órgano endocrino, productor de una gran variedad de moléculas señalizadoras, las adipoquinas que regulan desde el metabolismo y la homeostasis energética, a la respuesta inmune o la inflamación, (Galic *et al.*, 2010; Ouchi *et al.*, 2011; Rodríguez *et al.*, 2015). De esta manera, la alteración del metabolismo glucídico y lipídico y de la producción de adipoquinas asociada al exceso de tejido adiposo que ocurre en la obesidad están asociados a resistencia a insulina, lo que constituye un factor de riesgo principal en el desarrollo de diabetes tipo II, hipertensión, enfermedad cardiovascular o cáncer (Bluher, 2013; Kwon y Pessin, 2013; Rodriguez *et al.*, 2015).

En el mantenimiento de la homeostasis lipídica de los adipocitos juegan un importante papel tanto los factores y procesos que median los efectos de los reguladores de la incorporación, síntesis, almacenamiento y movilización de lípidos, la insulina en particular, como de los componentes intracelulares que regulan el funcionamiento de las GLs. En el primer aspecto, cabe destacar la función de las caveolas y, en el segundo, las proteínas que se asocian a la cubierta de las GLs.

Las caveolas son invaginaciones (50-100 nm) de la membrana plasmática enriquecidas en esfingolípidos y colesterol, que son especialmente abundantes en adipocitos (Hansen *et al.*, 2013; Parton y del Pozo, 2013). Las caveolas se caracterizan por contener dos familias de proteínas: caveolinas y cavinas (Hansen y Nichols, 2010). El principal tipo de caveolina en los adipocitos, caveolina 1 (CAV1), es responsable de la formación, junto con cavina 1 y 2, de las caveolas, así como de su mantenimiento, definiendo ambos tipos de

proteínas en gran medida las funciones de estos dominios de la membrana plasmática (Parton y del Pozo, 2013; Kovtun *et al.*, 2015; Nassar y Parrat, 2015). Entre otros procesos, las caveolas participan en procesos de transducción de señal, endocitosis, tráfico de lípidos, homeostasis del colesterol y mecanotransducción (Parton y del Pozo, 2013; Méndez-Giménez *et al.*, 2014; Echarri y del Pozo, 2015). En particular, las caveolas constituyen plataformas de señalización de hormonas de factores de crecimiento, como la insulina, cuyo receptor (receptor de insulina, IR) y sus mediadores, como el sustrato del IR (IRS), y efectores intracelulares, como el transportador GLUT4, se asocian a caveolas (Kanzaki, 2006; Frühbeck *et al.*, 2007; Lamaze y Torrino, 2015).

Por su parte, las gotas lipídicas constituyen el centro integrador del metabolismo lipídico en los adipocitos. Están constituidas por un núcleo hidrofóbico de lípidos neutros, principalmente TAGs en adipocitos, que está rodeado por una monocapa de fosfolípidos a la que se asocian una gran variedad de proteínas (Fujimoto y Parton, 2011; Walther y Farese, 2012; Thiam *et al.*, 2013; Rabanal-Ruiz, 2014). Entre éstas, hay lipasas y enzimas que participan en la síntesis de TAGs y fosfolípidos así como diversos miembros de las familias de perilipinas (PLIN) y Cide, que regulan la formación, crecimiento y mantenimiento de la función de las GLs (Walther y Farese, 2012; Kimmel y Sztalryd, 2016; Kory *et al.*, 2016). Además, las GLs están decoradas por proteínas que intervienen en procesos de transporte y en la interacción de las GLs con otros orgánulos relacionados con el metabolismo lipídico (retículo endoplásmico –RE-, mitocondrias, peroxisomas, etc), incluyendo componentes del citoesqueleto, GTPasas (Rab, Arf), y proteínas SNARE (Walther y Farese, 2012; Kimmel y Sztalryd, 2016; Kory *et al.*, 2016).

Recientemente, en nuestro grupo de investigación hemos identificado dos proteínas: una proteína de largos dominios de tipo *coiled-coil*, NECC2, localizada en caveolas en células neuroendocrinas, donde regula la señalización del factor de crecimiento NGF mediada por el receptor Tyr quinasa, TrkA (Díaz-Ruiz *et al.*, 2013), mientras que la otra, la GTPasa de bajo peso molecular Rab34, forma parte del proteoma asociado a las GLs de adipocitos 3T3-L1 (Rabanal, 2014). En este contexto, el presente trabajo ha estado centrado, por una parte, en la caracterización de NECC2 en cuanto a su posible localización en caveolas en adipocitos, así como su interacción con otros componentes de estos dominios (i.e., receptor de insulina y actina cortical) y su función en relación a la señalización de insulina asociada a caveolas. Por otra, hemos investigado la distribución de Rab34 a lo largo del proceso de adipogénesis y en adipocitos maduros e identificado sus interactores y las funciones de esta proteína en la citofisiología de los adipocitos. Como objetivo adicional, se ha investigado la regulación de ambas proteínas en condiciones patológicas (obesidad y resistencia a insulina).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para abordar los objetivos se han utilizado como modelos experimentales la línea celular 3T3-L1, a diferentes estadios de diferenciación, así como muestras de tejido adiposo humano y preadipocitos y adipocitos humanos aislados a partir de dichas muestras. En algunos estudios se ha utilizado además la línea celular de hepatocitos HepG2. En estas células, se ha utilizado microscopía confocal para analizar la distribución de las proteínas NECC2 y Rab34, endógenas o expresadas de forma exógena utilizando vectores de expresión contruidos específicamente para esta Tesis Doctoral, y su posible colocalización con marcadores de diversos compartimentos celulares. Estos estudios se han complementado con análisis de subfraccionamiento celular, incluyendo el aislamiento de caveolas de los adipocitos. Además, se han realizado la caracterización funcional de las dos proteínas mediante estudios de sobreexpresión y silenciamiento génico, determinando el impacto de la manipulación de los niveles de expresión de NECC2 y Rab34 sobre la señalización de insulina y la acumulación/movilización de lípidos en las GLs de los adipocitos, respectivamente. Con el fin de complementar los estudios funcionales, hemos puesto a punto una nueva técnica de identificación del interactoma, *BioID (proximity-dependent biotin identification; Roux et al., 2012)*, para su aplicación al estudio de Rab34 en adipocitos (y hepatocitos). Finalmente, analizamos la expresión de NECC2 y Rab34 en muestras de tejido adiposo humano, subcutáneo y visceral, de individuos delgados y de individuos obesos con diferentes grados de sensibilidad a insulina, además de en modelos *in vitro* que simulan las condiciones de hipertrofia, inflamación y/o resistencia a insulina que concurren habitualmente con obesidad.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Respecto a NECC2, los estudios llevados a cabo en células 3T3-L1 muestran que su expresión (ARNm y proteína), que se detecta ya en preadipocitos en etapas iniciales del proceso de diferenciación, aumenta de forma progresiva durante la adipogénesis. En adipocitos, NECC2 se distribuye en la superficie celular, donde colocaliza con CAV1, el receptor de insulina y la actina cortical, lo que apoya su asociación a caveolas en estas células. Estos resultados se han reforzado mediante el uso de diferentes tratamientos farmacológicos para desorganizar las caveolas (Metil- $\beta$ -ciclodextrina) o el citoesqueleto de actina (latrunculina). Mediante estudios de fraccionamiento celular, hemos establecido además que NECC2 es una proteína citosólica que se asocia de forma periférica a las caveolas, presumiblemente a través

de los dominios de interacción con CAV1 y colesterol presentes en su secuencia. Notablemente, la sobreexpresión de NECC2 provocó una estimulación prolongada de la señalización de insulina mediada por Akt, mientras que su silenciamiento alteró tanto la activación de Akt como de ERK1/2 inducidas por insulina. En esta línea, observamos que la expresión de NECC2 aumenta en el tejido adiposo humano, tanto visceral como subcutáneo, en condiciones de obesidad y resistencia a insulina, en relación a lo observado en individuos delgados. Los resultados observados en muestras de tejido adiposo humano *ex vivo* fueron corroborados en modelos *in vitro* de hipertrofia y resistencia a insulina (i.e., exposición crónica a palmitato, o a concentraciones elevadas de glucosa e insulina). En conjunto, estos resultados identifican, por primera vez, a NECC2 como un componente de las caveolas en adipocitos que es regulado en respuesta a obesidad y enfermedades metabólicas asociadas. Nuestras observaciones apoyan la participación de NECC2 en el mantenimiento de la función de las caveolas como plataformas de señalización regulando selectivamente cascadas específicas de señalización de la insulina.

Por su parte, descubrimos que Rab34 presenta una distribución dual, i.e., asociada al aparato de Golgi y/o a GLs dependiendo del estadio de diferenciación (temprano o tardío), y del nivel de expresión de dicha proteína (nivel fisiológico o sobreexpresión). De esta forma, hemos mostrado que en adipocitos no diferenciados (3T3-L1 o humanos), que mantienen aún su fenotipo fibroblástico carente de GLs, Rab34 se asocia al aparato de Golgi, donde participa en el mantenimiento de la estructura de este orgánulo. Sin embargo, la aparición de GLs en adipocitos, así como en hepatocitos tras la exposición a ácidos grasos, induce la translocación de Rab34 a la superficie de las GLs, donde presumiblemente llega mediante una ruta retrógrada a través del compartimento intermedio retículo endoplásmico-Golgi (ERGIC). Mediante nuestros estudios de colocalización y de BioID hemos mostrado que Rab34 interacciona con el sistema Arf1/COPI, que es responsable de la transferencia de ciertas proteínas a la cubierta de las GLs, tales como la lipasa ATGL o perilipina 2 (PLIN2) (Gao y Goodman, 2015). Estas observaciones están de acuerdo con nuestros estudios de sobreexpresión y silenciamiento de Rab34, que apoyan un papel para esta GTPasa en la regulación de la lipólisis y la lipogénesis en los adipocitos. En relación con la lipogénesis, el uso de técnicas de videomicroscopía en tiempo real en células vivas nos ha permitido establecer la ruta de internalización de lípidos asociada a Rab34 en adipocitos. Finalmente, como en el caso de NECC2, Rab34 también está regulada en el tejido adiposo humano, en particular en el depósito subcutáneo, en relación a obesidad si bien no se observan diferencias en el contenido de Rab34 respecto al desarrollo de resistencia a insulina en individuos obesos. Atendiendo a nuestros resultados en los modelos *in vitro*, los cambios observados en el tejido

adiposo de individuos obesos parecen ser el resultado de la suma o la interacción de los múltiples procesos de estrés celular que se activan en los adipocitos obesos. El conjunto de nuestros resultados en hepatocitos y en adipocitos, murinos y humanos, refuerza la idea del papel de Rab34 como marcador de la formación y/o mantenimiento de las GLs en condiciones normales y, presumiblemente, también en condiciones patológicas.

En resumen, el trabajo experimental incluido en este trabajo nos permite proponer, por primera vez, la participación de NECC2 y Rab34 como nuevos componentes de las caveolas y de las GLs, respectivamente, que contribuyen a la regulación del metabolismo lipídico mediante su acción sobre la señalización de insulina y la homeostasis de las GLs.



# INTRODUCCIÓN





## 1.1. Tejido adiposo

El tejido adiposo es un tejido conjuntivo de origen mesenquimal que hasta hace poco era considerado como un depósito pasivo de grasa. Sin embargo, actualmente se considera que constituye un depósito de energía altamente dinámico, almacenando el exceso de ácidos grasos en períodos de balance energético positivo y movilizándolos en períodos de demanda energética (Ducharme y Bickel, 2008). Concretamente, el tejido adiposo almacena los ácidos grasos procedentes de la dieta en forma de triglicéridos (TAGs) que, en situaciones de necesidad energética, son hidrolizados a través de la activación de las vías lipolíticas generando ácidos grasos que son transportados hasta otros tejidos en donde son utilizados como fuente de energía (Guilherme *et al.*, 2008). Adicionalmente, el tejido adiposo constituye un lugar esencial para la captación de glucosa, utilizada con una doble finalidad: la producción de energía para el funcionamiento celular y la síntesis del glicerol requerido para la esterificación de los ácidos grasos y su almacenaje (revisado en Malagón *et al.*, 2013). Finalmente, desde el descubrimiento de la leptina en 1994, se considera que el tejido adiposo es un importante órgano endocrino, productor de una gran variedad de moléculas señalizadoras, las adipocinas (Galic *et al.*, 2010). Hasta el momento, se han descrito cerca de 60 adipocinas producidas por los distintos componentes celulares del tejido adiposo, incluyendo hormonas, factores de crecimiento, citoquinas o quimioquinas, etc, que, entre otros procesos, regulan el metabolismo y la homeostasis energética, la respuesta inmune o la inflamación mediante su acción sobre diversos órganos (Ouchi *et al.*, 2011; Rodríguez *et al.*, 2015). De esta manera, la alteración del metabolismo glucídico y lipídico y de la producción de adipocinas asociada al exceso de tejido adiposo que ocurre en la obesidad están asociados a resistencia a insulina, lo que constituye un factor de riesgo principal en el desarrollo de diabetes tipo II, hipertensión, enfermedad cardiovascular o cáncer (Bluher, 2013; Kwon y Pessin, 2013; Rodríguez *et al.*, 2015).

En obesidad, el tejido adiposo sufre importantes cambios moleculares que afectan tanto a sus células como a la matriz extracelular (MEC) (Sun *et al.*, 2013; Rodríguez *et al.*, 2015; Pellegrinelli, *et al.*, 2016). Existen sólidas pruebas

experimentales que asocian la resistencia a insulina ligada a obesidad con la fibrosis, hipoxia e infiltración del tejido adiposo por células del sistema inmune e inflamación, lo que, junto con la hipertrofia de los adipocitos, pone en marcha diversos procesos de estrés celular en estas células que bloquean su respuesta a insulina y provocan muerte celular, además de inhibir la adipogénesis (Bluher, 2013; Malagón *et al.*, 2013; Trayhurn, 2013; Rodríguez *et al.*, 2015). Entre los procesos de estrés activados en los adipocitos en obesidad, se ha demostrado que el propio estrés mecánico inducido por la hipertrofia celular, el estrés del retículo endoplásmico (RE), la disfunción mitocondrial y estrés oxidativo, o la autofagia, que confluyen en la activación de rutas proinflamatorias en los adipocitos, contribuyen a la disfunción de estas células (Malagón *et al.*, 2013; Díaz-Ruiz A, *et al.*, 2015). Rodríguez *et al.*, 2015). En estas condiciones, los adipocitos dejan de cumplir su función como almacenadores de lípidos, de manera que éstos se acumulan en localizaciones ectópicas (Frühbeck *et al.*, 2014; Rodríguez *et al.*, 2015; Rutkowski *et al.*, 2015). Se ha propuesto que la acumulación de lípidos y el subsiguiente proceso de lipotoxicidad en tejidos como músculo, hígado o páncreas, junto con la alteración en el patrón de adipoquinas, son responsables del desarrollo de resistencia a insulina asociada a obesidad (Virtue y Vidal-Puig, 2010).

### **1.1.1. Tipos de tejido adiposo**

El tejido adiposo constituye un órgano complejo que se distribuye en varias localizaciones corporales, y se clasifica atendiendo a su estructura, localización, vascularización, color, y función (Chen *et al.*, 2016). Tradicionalmente se definen dos tipos principales de tejido adiposo: el tejido adiposo blanco (TAB) y el tejido adiposo marrón (TAM). Ambos tipos de grasa almacenan la energía en forma de TAGs, aunque en el TAB éstos se acumulan en una única gota lipídica (GL), mientras que en los adipocitos del TAM, se distribuyen en varias gotas lipídicas (Vázquez-Vela, *et al.*, 2008).

El TAM tiene como principal función la regulación térmica corporal vía termogénesis sin escalofrío, mediante la disipación de la energía almacenada en

forma de calor (Virtanen *et al.*, 2009). Por su lado, el TAB es el tejido adiposo más abundante y se distribuye en varios depósitos, siendo la grasa visceral (TAV) y la subcutánea (TASC) las más abundantes (Kelley *et al.*, 2000; Rodríguez A *et al.*, 2015).

El TAV incluye el tejido adiposo omental, mesentérico y retroperitoneal así como el peri gonadal (Wajchenberg, 2000), mientras que el TASC se localiza debajo de la piel a lo largo de todo el cuerpo (Shi H, *et al.*, 2009). Entre estos depósitos existen importantes diferencias morfológicas y moleculares (Tchkonina *et al.*, 2013). Concretamente, el TAV muestra una menor sensibilidad a la insulina pero una mayor sensibilidad a catecolaminas que el TASC (revisado en Wajchenberg, 2000; Wajchenberg *et al.*, 2002). Estos depósitos también difieren en cuanto a la capacidad proliferativa y de diferenciación de sus pre adipocitos (mayor en TASC) así como en la tasa de apoptosis (mayor en TAV) (Tchkonina *et al.*, 2013). Finalmente, TASC y TAV difieren en las adipoquinas que producen: más adiponectina (con funciones insulino-sensibilizantes) en TASC (Fain *et al.*, 2003) y más citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, TNF- $\alpha$ ) en TAV (Fain *et al.*, 2003; Vohl *et al.*, 2004). De hecho, el TAV presenta una mayor infiltración de macrófagos que el TASC (Harman-Boehm *et al.*, 2007; O'Rourke *et al.*, 2009). De esta manera, atendiendo a estas características y estudios epidemiológicos, actualmente se considera que la obesidad omental está altamente relacionada con un mayor riesgo a generar síndrome metabólico (i.e. resistencia a insulina, diabetes de tipo 2, dislipidemia, enfermedad cardiovascular, hipertensión), mientras que se ha sugerido que el TASC puede desempeñar un papel protector desde un punto de vista metabólico (Wajchenberg *et al.*, 2002; Snijder *et al.*, 2003; Hamdy *et al.*, 2006; Smith, 2015; Pellegrinelli, *et al.*, 2016).

Por otra parte, un estudio reciente demostró que los humanos adultos también poseen TAM funcional, aunque su cantidad es variable dependiendo de la edad, el sexo, la temperatura y el peso corporal (Virtanen *et al.*, 2009). A partir de este hallazgo se ha descrito la existencia de un tercer tipo de grasa, la grasa "beige" o "brite" que, como el TAM, expresan la proteína UCP-1/termogenina y tiene por tanto capacidad termogénica (Wu *et al.*, 2012; revisado en Rodríguez *et al.*, 2015; Cereijo *et al.*, 2015).

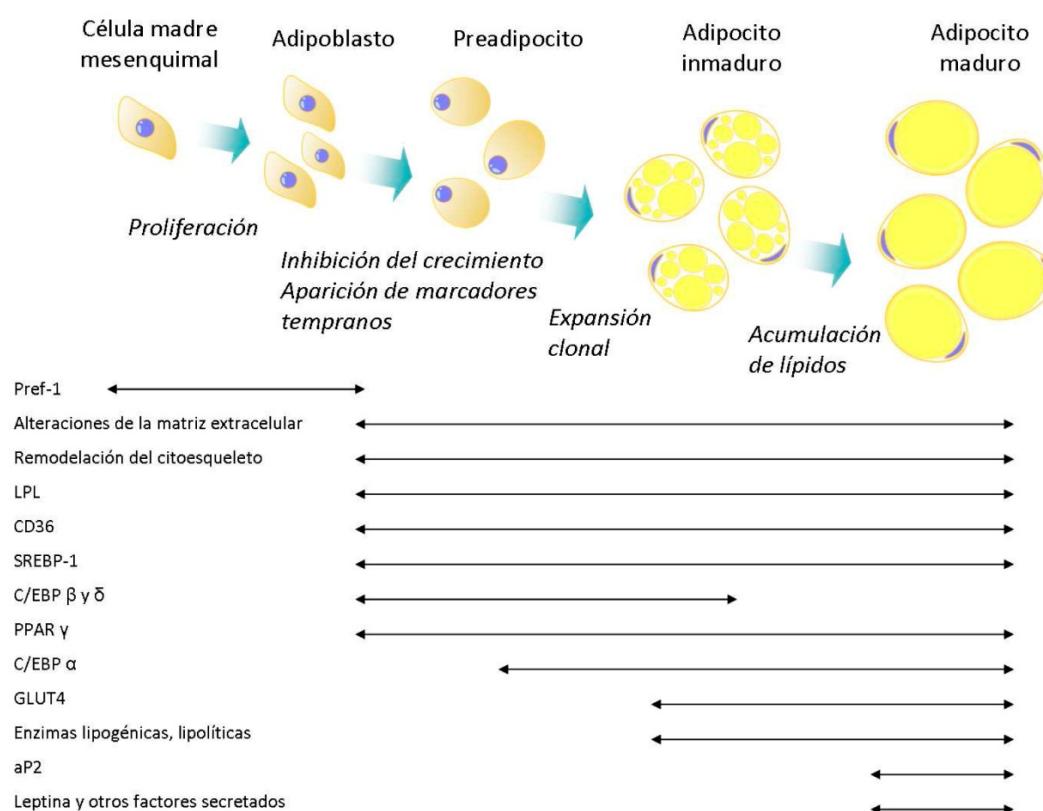
### 1.1.2. Adipogénesis y componentes celulares del tejido adiposo

El tejido adiposo está constituido por adipocitos maduros inmersos en una matriz de colágeno (Mariman y Wang, 2010). En la matriz también residen células madre mesenquimales, preadipocitos, células sanguíneas y tejido vascular, que, en conjunto, constituyen la denominada fracción de estroma vascular (FEV) (Frayn *et al.*, 2003). Por su parte, las células madre mesenquimales (CMMs) y los preadipocitos de la FEV permiten la renovación de las células maduras del tejido mediante el proceso de adipogénesis (Berry y Rodeheffer, 2013).

#### 1.1.2.1. Adipogénesis

El preadipocito es una célula de tipo mesenquimal derivada de células pluripotentes que, en respuesta a estímulos específicos, tiene la capacidad de diferenciarse en adipocito por el proceso de adipogénesis. La adipogénesis implica la acción coordinada de numerosos efectores extracelulares, que disparan diferentes rutas de señalización intracelular y activan varios factores de transcripción, los cuales dirigen la transformación de los preadipocitos hacia adipocitos acumuladores de lípidos (revisado en Fève, 2005; Rosen y MacDougald, 2006; Christoloudides *et al.*, 2009; Lefterova y Lazar, 2009; White y Stephens, 2010; Cristancho y Lazar, 2011). Este programa molecular dirige las fases sucesivas del proceso de adipogénesis: determinación y parada del crecimiento celular, expansión clonal y diferenciación terminal (Otto y Lane, 2005). El primer paso en la adipogénesis consiste en la transición de células madre embrionarias en células mesenquimales las cuales se transforman entonces en preadipocitos blancos comprometidos en respuesta a factores como la rigidez de la matriz extracelular, la confluencia celular o la forma celular (Cristancho y Lazar, 2011). Una vez que los preadipocitos entran en el programa adipogénico, se pone en marcha una cascada transcripcional en la que participan varios factores de transcripción, entre los cuales PPAR $\gamma$ , CCAAT/ *enhancer-binding protein*-  $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ ), C/EBP $\beta$  y C/EBP $\delta$ , junto con la coordinación epigenómica entre estos factores (Lefterova *et al.*, 2008; Nielsen *et al.*, 2008), son los principales inductores de la expresión de los genes que definen el fenotipo adipocitario durante

la fase de diferenciación terminal (Cristancho y Lazar, 2011). Entre los genes diana asociados a la diferenciación de los adipocitos se encuentran genes metabólicos como la proteína de unión a ácidos grasos 4 (*fatty acid-binding protein 4*; FABP4), el transportador de glucosa 4 (GLUT4), la sintasa de ácidos grasos (*fatty acid synthase*, FAS), el receptor de insulina (IR) y el sustrato del IR (IRS), o la lipasa sensible a hormona (*hormone sensitive lipase*; HSL) así como adipoquinas como leptina y adiponectina (Wu *et al.*, 1999; Cristancho y Lazar, 2011). A nivel fenotípico, la inducción de los genes metabólicos promueve la formación y acumulación de gotas lipídicas, que van aumentando de tamaño de forma progresiva y se fusionan hasta formar la gran gota lipídica característica de los adipocitos blancos (Fig. 1).



**Figura 1. Adipogénesis.** Proceso temporal y factores implicados en la diferenciación de los adipocitos (original de Pulido, 2011, modificado de Frühbeck y Gómez-Ambrosi, 2005).

Entre los estímulos que inducen el programa adipogénico se encuentran los glucocorticoides (i.e., dexametasona) así como agonistas de AMPc (IBMX), además de la insulina (Cristancho y Lazar, 2011; Jia *et al.*, 2012; Saben *et al.*, 2014). De hecho, estos compuestos forman parte del coctail hormonal que se utiliza para inducir la

diferenciación de los predipocitos a adipocitos *in vitro*. Entre los modelos celulares más utilizados en los estudios de diferenciación se encuentran los fibroblastos embrionarios de ratón 3T3-L1. En presencia de insulina, dexametasona e IBMX, las células 3T3-L1 pasan a través de varias etapas consecutivas que incluyen la repliación del ADN (día 1), que facilita la accesibilidad de los factores de transcripción inductores del fenotipo adipocitario, parada del crecimiento (día 2), expresión de marcadores de diferenciación tardíos (día 3), incluyendo enzimas lipogénicas y lipolíticas así como otras proteínas implicadas en el metabolismo lipídico y, finalmente, acumulación de gotas lipídicas (días 4-7) (Ntambi y Young-Cheul, 2000) las cuales, a diferencia de lo que ocurre en los adipocitos primarios, no llegan a coalescer para formar una gota lipídica única.

#### **1.1.2.2. Componentes del tejido adiposo**

##### **1.1.2.2.1. Adipocitos**

Los adipocitos constituyen el principal componente celular del tejido adiposo. Los adipocitos del tejido adiposo blanco son células esféricas, con un diámetro de 20-200  $\mu\text{m}$ , caracterizadas por contener una gran gota lipídica (GL) central y un núcleo plano localizado en la periferia celular (Bloor y Symonds, 2014). Los adipocitos están programados para sintetizar, almacenar y liberar energía en forma de ácidos grasos en respuesta a las demandas energéticas del organismo. Adicionalmente, los adipocitos tienen la capacidad de ejercer una fuerte influencia sobre el resto de las células del organismo mediante la secreción de adipoquinas (Burcelin, 2013).

La capacidad de los adipocitos para almacenar y distribuir energía reside en su orgánulo intracelular característico, las GLs, que acumulan TAGs, diglicéridos (DAGs), fosfolípidos, ácidos grasos no esterificados y colesterol (Murphy, 2001; Kuerschner *et al.*, 2008). Estas reservas de energía son utilizadas de forma estrictamente regulada a través de varios sistemas coordinados para proporcionar una respuesta celular adecuada a los estímulos extracelulares. Así, en condiciones de escasez energética y en respuesta fundamentalmente a las catecolaminas, los TAGs son rápidamente hidrolizados y los ácidos grasos resultantes son liberados a la

circulación para ser transportados hacia otros tejidos, donde son utilizados como fuente energética (revisado en Duncan *et al.*, 2007). Tras la ingesta, y en respuesta a la insulina, los ácidos grasos procedentes de la dieta son esterificados y los TAGs resultantes son almacenados en la GL. A pesar de que la GL ocupa prácticamente todo el citosol, los adipocitos también son ricos en orgánulos, que se localizan en la estrecha franja periférica que rodea la GL central.

#### **1.1.2.2.2. La membrana del adipocito**

La membrana plasmática de las células eucariotas es una estructura con una elevada organización, constituida por cientos de especies de lípidos y proteínas distribuidos de manera asimétrica en ambos lados de la bicapa (Pomorski *et al.*, 2001; Edidin, 2003). Las características biofísicas de los lípidos de membrana, junto con las interacciones que se establecen entre ellos y con proteínas asociadas a la misma, de forma periférica o integral, permiten la organización y segregación de la membrana plasmática en microdominios, como los *lipid rafts* o balsas lipídicas (Levental y Veatch, 2016; Lorent y Levental, 2015). Las balsas lipídicas son microdominios de membrana heterogéneos (entre 10 y 200 nm), altamente dinámicos, enriquecidos en esfingolípidos y colesterol, y que permiten la organización espacial de diferentes procesos celulares (Helms y Zurzolo, 2004; Staubach y Hanisch, 2011). En estos dominios, los esfingolípidos se sitúan en la cara externa de la bicapa y se asocian lateralmente mediante la interacción de sus grupos polares. Por otra parte, el colesterol se sitúa entre las cadenas saturadas de los esfingolípidos, por las que tiene mayor afinidad, lo que proporciona rigidez a estos dominios (Lingwood y Simons, 2010). Los componentes de los *lipid rafts* se caracterizan bioquímicamente por su resistencia a detergentes, de manera que, tras la solubilización de membranas o células con detergentes no iónicos como el Tritón X-100, los lípidos asociados a los *rafts* permanecen insolubles y pueden ser aislados (Ehehalt *et al.*, 2006). También se caracterizan por su capacidad de flotación en gradientes de sacarosa, que es el método que ha sido tradicionalmente utilizado para el aislamiento y caracterización de estos microdominios (Zheng y Foster, 2009). Los *lipid rafts* están involucrados en una variedad de procesos celulares entre los cuales están la transducción de señales



en numerosas rutas, la clasificación de proteínas en la endocitosis y exocitosis, la organización del citoesqueleto, la transmisión sináptica, apoptosis, adhesión y migración celular (Munro, 2003; Lajoie y Nabi, 2010; Staubach *et al.*, 2011; Varshney *et al.*, 2016). De esta manera, se ha asociado la alteración de la estructura y/o función de los *lipid rafts* con el desarrollo de diversas enfermedades, como enfermedades neurodegenerativas, aterosclerosis o cáncer (Staubach y Hanisch, 2011; Sonnino *et al.*, 2014; Sorci-Thomas y Thomas, 2016).

Se han descrito diferentes tipos de *lipid rafts*, entre los que se encuentran los denominados CLIC-D (*clathrin-independent carriers dynamin-dependent*), CLIC-ID (*clathrin-independent carriers dynamin-independent*), los macropinosomas dependientes de *rafts* y, por último, los más conocidos y estudiados, las caveolas (Kirkham y Parton, 2005).

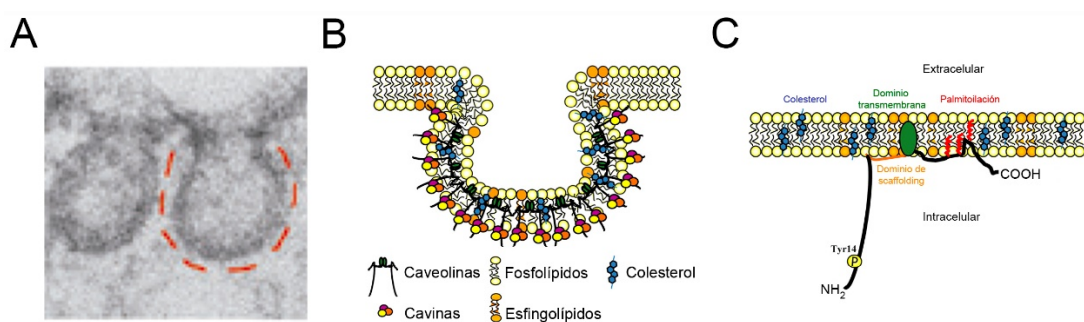
## 1.2. Caveolas

Las caveolas están presentes en una gran variedad de tejidos y tipos celulares, siendo especialmente abundantes en adipocitos y células endoteliales y musculares (Hansen *et al.*, 2013; Parton y del Pozo, 2013). Las caveolas son invaginaciones generalmente esféricas o en forma de botella de la membrana plasmática, de 50-100 nm de diámetro, con un alto contenido en esfingolípidos y colesterol (Parton y Simons, 2007; Parton y del Pozo, 2013) (Fig. 2 A y B). No obstante, dependiendo del estado fisiológico celular, las caveolas pueden adquirir estructuras vesiculares, tubulares, en forma de racimo, o una forma plana en ausencia de colesterol (Thomas y Smart, 2008; Simons y Gerl, 2010). En particular, las caveolas en adipocitos se agrupan formando estructuras de orden superior, las denominadas rosetas o *clusters* de caveolas (Parton y del Pozo, 2013).

Además de por su morfología característica, una de las diferencias más importantes entre las caveolas y el resto de *lipid rafts* es la presencia de dos componentes estructurales característicos: las proteínas caveolinas y las proteínas cavininas (Hansen y Nichols, 2010). Respecto a las caveolinas, forman una familia de proteínas integrales de membrana que está constituida por tres miembros:

caveolina-1 (CAV1), la más abundante de la familia, caveolina-2 (CAV2) y caveolina-3 (CAV3) (Shvets *et al.*, 2014)

La presencia de caveolas en las células depende de la expresión de CAV1, que define las principales funciones de estos dominios de membrana (Root *et al.*, 2015). De hecho, la expresión de CAV1 es suficiente para inducir la formación de caveolas en líneas celulares que carecen de estas estructuras, y también para restablecer las caveolas en células de ratones *knock-out* para CAV1 (Fra *et al.*, 1995; Kirkham *et al.*, 2008; Hansen y Nichols, 2010). CAV1 tiene una amplia distribución, aunque es más abundante en adipocitos, células endoteliales, fibroblastos, neumocitos, células epiteliales, endoteliales y neuronas (Méndez-Giménez *et al.*, 2014; Shvets *et al.*, 2014). CAV2 suele co-expresarse con CAV1 y puede formar complejos moleculares hetero-oligoméricos con ésta. CAV3 se expresa exclusivamente en células del linaje muscular (músculo esquelético y cardiomiocitos) y es esencial para la formación de caveolas en estos tipos celulares (Méndez-Giménez *et al.*, 2014; Shvets *et al.*, 2014).



**Figura 2.** Estructura de caveolas. (A) Imágenes de microscopía electrónica de caveola (Parton y del Pozo, 2013). (B) Diagrama representativo de la composición lipídica y proteica de las caveolas. (C) Estructura y disposición de la proteína CAV1 en una caveola (tomado de Méndez-Giménez *et al.*, 2014).

Las caveolinas son proteínas integrales de membrana, con cuatro dominios: dominio N-terminal, dominio de *scaffolding* (CSD, residuos 82–101 en CAV1), un dominio central transmembrana hidrofóbico (TMD, residuos 102-134 en CAV1), y dominio N-terminal (Fig. 2C) (Parton y del Pozo, 2013; Root *et al.*, 2015). El dominio transmembrana está compuesto por 2  $\alpha$ -hélices separadas por una región de tres residuos con una prolina (P110) que genera un ángulo de  $\sim 50^\circ$  entre las dos  $\alpha$ -hélices (Monier *et al.*, 1995; Root *et al.*, 2015). De esta forma, las caveolinas adquieren una

conformación en horquilla en la bicapa lipídica, quedando expuestos los extremos N- y C-terminal hacia la cara citoplasmática (Root *et al.*, 2015) (Fig. 2C). Además, el anclaje a la membrana celular de las caveolinas está facilitado por el proceso de palmitoilación que, en el caso de CAV1, ocurre en tres residuos de cisteína del extremo C-terminal (residuos 133, 143 y 156) (Méndez-Giménez *et al.*, 2014; Root *et al.*, 2015). En la región N-terminal se encuentra el dominio de *scaffolding*, que permite la interacción de las caveolinas con otras proteínas, entre otras con receptores tirosina quinasa (RTK), la subunidad  $\alpha$  de proteínas G, miembros de la familia de GTPasas H-Ras y las quinasas Src, los receptores EGF Neu, y la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) (Simons y Toomre, 2000; Thomas y Smart, 2008; Méndez-Giménez *et al.*, 2014; Root *et al.*, 2015). También se acepta que las caveolinas, como CAV1 y CAV3 ayudan a compartimentalizar y regulan señalizadores intracelulares, como fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K)/proteína quinasa B (Akt), quinasas 1 y 2 relacionadas con señal extracelular (ERK1/2), y proteína quinasa C (PKC), entre otras (Der *et al.*, 2006; Das *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2016). Inicialmente se propuso que el CSD interaccionaba con una secuencia consenso, denominada dominio de unión a caveolina (CBD), presente en proteínas que interactúan con caveolinas (Root *et al.*, 2015). No obstante, resultados de estudios estructurales y bioinformáticos recientes sugieren que la presencia de esta secuencia no es indicativa de una interacción directa de CAV1 con sus proteínas asociadas (Root *et al.*, 2015). Actualmente se acepta que ciertas modificaciones post-transduccionales, como los anclajes de tipo glicosil-fosfatidilinositol (GPI), la palmitoilación y la miristoilación permiten localizar las proteínas en las caveolas/*lipid rafts* (revisado en Head *et al.*, 2014).

En las caveolas, la CAV1 es modificada por la acción de varias enzimas. Por ejemplo, la fosforilación de CAV1 se lleva a cabo por PKC $\alpha$  en residuos serina/treonina (Mineo *et al.*, 1998), y por la tirosina quinasa c-Src (*cellular sarcoma proto-oncogen tyrosine kinase*) en varios residuos tirosina, siendo Tyr14 el más importante. Se ha propuesto que la fosforilación en este residuo regula la endocitosis de caveolas, gracias al reclutamiento de dinamina (Lajoie y Nabi, 2007; Shajahan *et al.*, 2007). Una vez endocitadas, las caveolas pueden bien fusionarse con endosomas tempranos y volver de vuelta a la membrana plasmática o integrarse en cuerpos multivesiculares para su degradación (Méndez-Giménez *et al.*, 2014). Por su parte,

CAV2, que está presente en caveolas en una proporción 1:2 ó 1:4 respecto a CAV1 (Scherer *et al.*, 1997; Scheiffele *et al.*, 1998), es fosforilada en las serinas 23 y 36, modulando la formación de caveolas dependiente de CAV1 (Sowa *et al.*, 2003; Sowa *et al.*, 2008). Adicionalmente, la fosforilación de CAV2 en tirosina 19 por insulina se ha asociado con la interacción del receptor de esta hormona con pERK y la fosforilación en el residuo tirosina 27 se ha asociado con la activación mantenida del receptor de insulina (Kwon *et al.*, 2009; Kwon y Pak, 2009).

Es importante destacar que CAV1 no solamente se encuentra asociada a caveolas. Así, varios estudios han demostrado la translocación de CAV1 desde la membrana plasmática a la superficie de las gotas lipídicas, especialmente cuando se estimula la lipólisis o cuando las células son expuestas a colesterol o ácidos grasos, ya que CAV1 también se une a estos últimos (Ostermeyer *et al.*, 2001; Pol *et al.*, 2004; Parton y del Pozo, 2013; Moreno-Castellano *et al.*, 2016a).

### 1.2.1. Familia de cavininas

La familia de proteínas cavininas está constituida por 4 miembros: cavina-1, cavina-2, cavina-3 y cavina-4 (Hansen y Nichols, 2010; Briand *et al.*, 2011). Son proteínas periféricas de membrana y específicas de vertebrados, con pesos moleculares entre 31 y 60 kDa (Kovtun *et al.*, 2015). Presentan uno o varios dominios de cremallera de leucina, que son los responsables de la asociación de cavina-1 y cavina-3 a la membrana de caveolas, varios dominios PEST (dominios ricos en prolina, ácido glutámico, serina y treonina) implicados en marcar estas proteínas para su degradación, y un dominio de unión a fosfatidilserina, que se ha propuesto que participa en el reclutamiento de las cavininas a la membrana plasmática (revisado en Kovtun *et al.*, 2015). Todos los miembros de esta familia interactúan entre sí para formar complejos multiméricos que se asocian con las caveolas a nivel de la membrana plasmática, de manera que participan en la fase final de la biogénesis de caveolas (Hayer *et al.*, 2010). Las cavininas, junto con las caveolinas, constituyen el denominado complejo de cubierta de las caveolas (complejo 80S), cuya estequiometría se ha propuesto que corresponde a 12 caveolinas y 3 cavininas-1, y 1 cavina-2 o cavina-3 (Shvets *et al.*, 2014). En conjunto, un complejo de cubierta

comprendería 150–200 moléculas de caveolina y aproximadamente 50 de cavinas (Gambin *et al.*, 2013), mientras que se ha propuesto que una caveola contendría aproximadamente 200.000 moléculas de colesterol (Ortegren *et al.*, 2004).

Cavina-1, inicialmente denominada PTRF (*Polimerase I and transcript release factor*), tiene una expresión ubicua, similar a la de CAV1, con altos niveles de expresión en adipocitos, pulmón, corazón y colon (revisado en Kovtun *et al.*, 2015; Nassar *et al.*, 2015). Cavina-1 que, como CAV1, forma homo-oligómeros, colabora con ésta en el ensamblaje y mantenimiento de las caveolas (Méndez-Giménez *et al.*, 2014; Kovtun *et al.*, 2015; Nassar *et al.*, 2015). La ausencia de cavina-1 genera la desaparición de las caveolas y la pérdida de expresión proteica de las tres isoformas de CAV1 (Méndez-Giménez *et al.*, 2014; revisado en Kovtun *et al.*, 2015; Nassar *et al.*, 2015). Concretamente, los ratones carentes de cavina-1 presentan, como los CAV1-KO, menos tejido adiposo y dislipemia y sus adipocitos, más pequeños, son insensibles a señales lipolíticas (Méndez-Giménez *et al.*, 2014). Cavina-2, que es abundante en tejido adiposo y pulmón, participa en la generación de la curvatura de la membrana en las caveolas (Méndez-Giménez *et al.*, 2014; Kovtun *et al.*, 2015; Nassar *et al.*, 2015). Por su parte, cavina-3 participa en la organización de caveolas que geman de la membrana y en el tráfico intracelular de caveolas (McMahon *et al.*, 2009). Por último, cavina-4 es específica de músculo esquelético y cardíaco, por lo que se denominó inicialmente como MURC (*muscle-restricted coiled-coil protein*). Se ha propuesto que cavina-4 ayuda a reclutar ERK1/2 a las caveolas en respuesta a estimulación  $\alpha$ 1-adrenérgica (Ogata *et al.*, 2014).

### 1.2.2. Otros componentes de las caveolas

Además de caveolinas y cavinas, muy recientemente se ha descrito la presencia de otros componentes de las caveolas que, aunque no son esenciales para la formación de estos compartimentos, participan en la red proteica que define la morfología, dinámica y endocitosis de las caveolas (Kovtun *et al.*, 2015; revisado en Shvet *et al.*, 2015). Entre estas proteínas, que se concentran sobre todo en la parte del cuello de la caveola, está la dinamina, una GTPasa que participa en la

estrangulación de las vesículas de endocitosis, y una ATPasa de tipo dinamina que participa en la endocitosis, EHD2, así como PACSIN2 (también denominada syndapin2), que contiene un dominio de unión/curvado a curvaturas de membrana (dominio F-BAR) y participa en la morfogénesis de estas estructuras (Kovtun *et al.*, 2015; Shvet *et al.*, 2015).

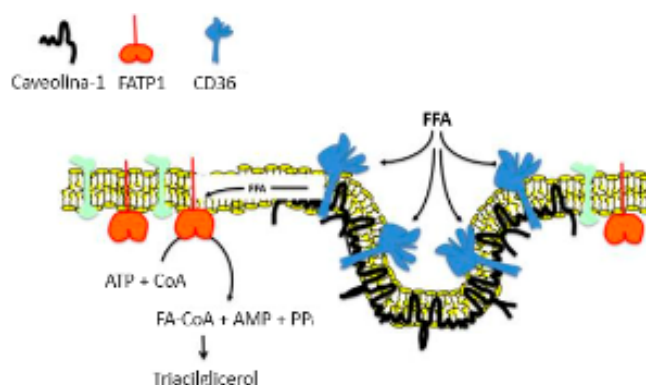
Además de las proteínas citadas, otros componentes de las caveolas lo constituyen elementos del citoesqueleto y, concretamente, filamentos de actina cortical, que son particularmente abundantes en la región del cuello de las caveolas, donde también se localizan proteínas de unión a actina, tales como las proteínas ezrin-radixin-moesin (ERM), talina o filamina, que interacciona con CAV1 (Foti *et al.*, 2007). El citoesqueleto de actina por debajo de la membrana plasmática regula la integridad de las caveolas y el movimiento de CAV1 en la superficie celular (Sverdlov *et al.*, 2009). Mediante estudios de tomografía por microscopía electrónica en varios tipos celulares, incluyendo adipocitos 3T3-L1, se ha observado que las caveolas de una célula están interconectadas entre sí a través del citoesqueleto de actina y microtúbulos corticales (Richter *et al.*, 2008). De hecho, se ha propuesto que la formación de agrupaciones (*clusters*) de caveolas/*lipid rafts* depende del colesterol y la unión (*tethering*) de actina a la membrana (Head *et al.*, 2014). Finalmente, en estudios recientes de nuestro laboratorio hemos demostrado que un miembro de la familia de las septinas, que se consideran como el cuarto elemento del citoesqueleto, septina 11, se localiza en caveolas e interacciona con CAV1 (Mostowy y Cossart, 2012) formando estructuras en forma de anillo que colocalizan con las rosetas de caveolas (Moreno-Castellanos *et al.*, 2016b). Estos resultados y datos de estudios funcionales han llevado a proponer un papel de esta proteína del citoesqueleto en el mantenimiento de la función de las caveolas como plataformas de señalización de la insulina y del tráfico de lípidos en adipocitos (Moreno-Castellanos *et al.*, 2016b).

### 1.2.3. Funciones de las caveolas

Las caveolas cumplen una gran variedad de funciones, incluyendo su participación en procesos de transducción de señales, endocitosis, invasión de patógenos, apoptosis, tráfico de lípidos, homeostasis del colesterol, proliferación, y

mecanotransducción (Frühbeck *et al.*, 2007; Parton y Simons, 2007; Parton y del Pozo, 2013; Méndez-Giménez *et al.*, 2014; Shvets *et al.*, 2014; Cheng y Nichols, 2016; Han *et al.*, 2016).

Inicialmente su función fue asociada al transporte vesicular de solutos en células endoteliales, mediante el proceso de transcitosis (Stan, 2002). Posteriormente se ha visto que, además de participar en procesos de transporte, también constituyen una vía de entrada para virus y bacterias (Pelkmans, 2005), para componentes de membrana como glicoesfingolípidos, o para el colesterol, participando en el transporte del mismo entre distintos compartimentos intracelulares (Smart *et al.*, 1996; Pol *et al.*, 2005). Por ello, las caveolas funcionan como sensores y reguladores de la homeostasis celular y participan en el control de la composición de lípidos y la incorporación de ácidos grasos a través de la membrana plasmática (Parton y Simons, 2007; Parat, 2009; Parton y Del Pozo, 2013). De hecho, como se ha mencionado anteriormente, la ausencia de caveolas por pérdida y/o mutaciones de CAV1 y/o cavina-1 produce lipodistrofia (Méndez-Giménez *et al.*, 2014; Shvets *et al.*, 2014). En particular, en las caveolas se localiza el transportador de ácidos grasos de cadena larga y de colesterol, FAT/CD36, que se asocia a CAV1, así como proteínas transportadoras de ácidos grasos que catalizan la esterificación dependiente de ATP de ácidos grasos de cadena muy larga (FATP1, FATP4) (Thompson *et al.*, 2010; Pilch y Liu, 2011) (Fig. 3).



**Figura 3.** Entrada de ácidos grasos a través de su unión a CD36 en caveolas. Los ácidos grasos difunden lateralmente en la membrana plasmática y a través de un mecanismo de *flip-flop* llegan a la cara interna de la membrana donde son esterificados por la proteína transportadora de ácidos grasos FATP1. Tomado de Thompson *et al.*, 2010.

Adicionalmente, las caveolas participan en procesos de adhesión y migración celular (Parat, 2009). De hecho, en células migratorias la distribución de caveolinas y caveolas difiere del resto de células, y se ha demostrado que las caveolas se localizan en la interfaz entre el citoesqueleto y la matriz extracelular en las adhesiones focales (Echarri *et al.*, 2007). Por otro lado, en células endoteliales y de músculo liso las caveolas actúan como mecanosensores (Parton y Simons, 2007; Parton y Del Pozo, 2013). Respecto a su función en la mecanotransducción, se ha propuesto que las caveolas/lipid rafts pueden servir como plataformas para el amarraje del citoesqueleto y para la comunicación con la matriz extracelular vía integrinas y otras moléculas de adhesión celular (Head *et al.*, 2014).

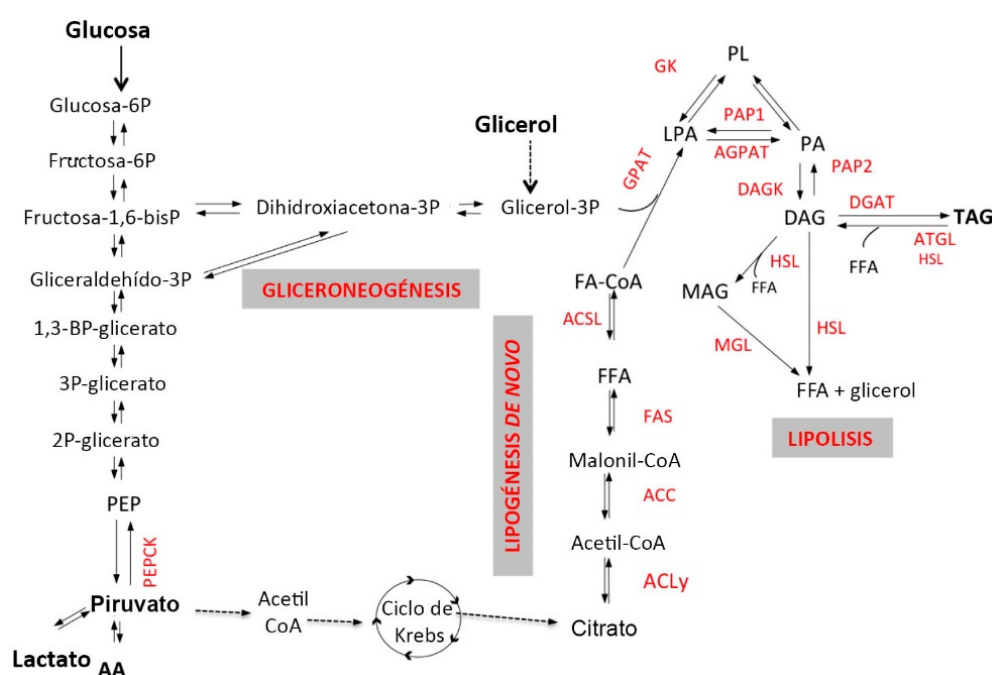
Por último, las caveolas constituyen plataformas moleculares que permiten la concentración e interacción de un número importante de componentes de las vías de señalización intracelular, como los receptores asociados a proteínas G, receptores de factores de crecimiento (EGF-R, VEGF-R), o el receptor de insulina (IR), el transportador de glucosa Glut4, proteínas de unión a GDP/GTP como H-Ras o eNOS, tirosina quinasas (Fyn, Src), serina/treonina quinasas (Raf, MAPK, PKA, PI3K, o PKC), o proteínas adaptadoras (Shc, Grb2) (Williams y Lisanti, 2004; Lamaze y Torrino, 2015). Gran parte de estas interacciones ocurren a través del dominio de *scaffolding* de CAV1, dando lugar a la regulación, positiva o negativa, de las proteínas diana. En el caso particular de los adipocitos, se ha demostrado que el IR y varios intermediarios de las rutas de transducción que se activan a través de este receptor (CAP-Cbl, TC10, componentes del exocisto), se localizan en caveolas y que la disrupción de éstas últimas o la eliminación del IR en las mismas, altera o elimina la señalización mediada por insulina (Kanzaki, 2006; Foti *et al.*, 2007; Frühbeck *et al.*, 2007). Más aún, la interacción de CAV1 con el IR provoca la estimulación de su actividad tirosina quinasa (Yamamoto *et al.*, 1998). Aunque existe una cierta controversia, existen estudios que apoyan que el transportador de glucosa GLUT4 se transloca tras la estimulación con insulina, al menos parcialmente, a caveolas, en las que también se produce su endocitosis posterior (Yuan *et al.*, 2007). Adicionalmente, el tratamiento con insulina también provoca que el IR se internalice en caveolas y colocalice con CAV1 fosforilada en Y14, proceso necesario para que se produzca la endocitosis de las caveolas (Fagerholm *et al.*, 2009). En esta línea, los ratones CAV1-KO presentan una



importante reducción en los niveles proteicos del IR, de GLUT4 y de la captación de glucosa, lo que está acompañado, como se ha mencionado, por una morfología atípica de los adipocitos y la alteración de la arquitectura de las gotas lipídicas (Cohen *et al.*, 2004; Le Lay y Kurzchalia, 2005; Wunderlich *et al.*, 2006; Albinsson *et al.*, 2007).

### 1.3. Regulación del metabolismo en adipocitos

Como se mencionó anteriormente, el tejido adiposo almacena la energía en forma de TAGs en las GLs (i.e., lipogénesis), que posteriormente serán hidrolizados en ácidos grasos y glicerol en situaciones de demanda energética (lipólisis) (Fig. 4). Los procesos de almacenamiento y movilización de energía en los adipocitos está controlado por un complejo sistema multifactorial, en el que la insulina y las catecolaminas juegan un papel fundamental (Moro *et al.*, 2004; Czech *et al.*, 2013; Malagón *et al.*, 2013).



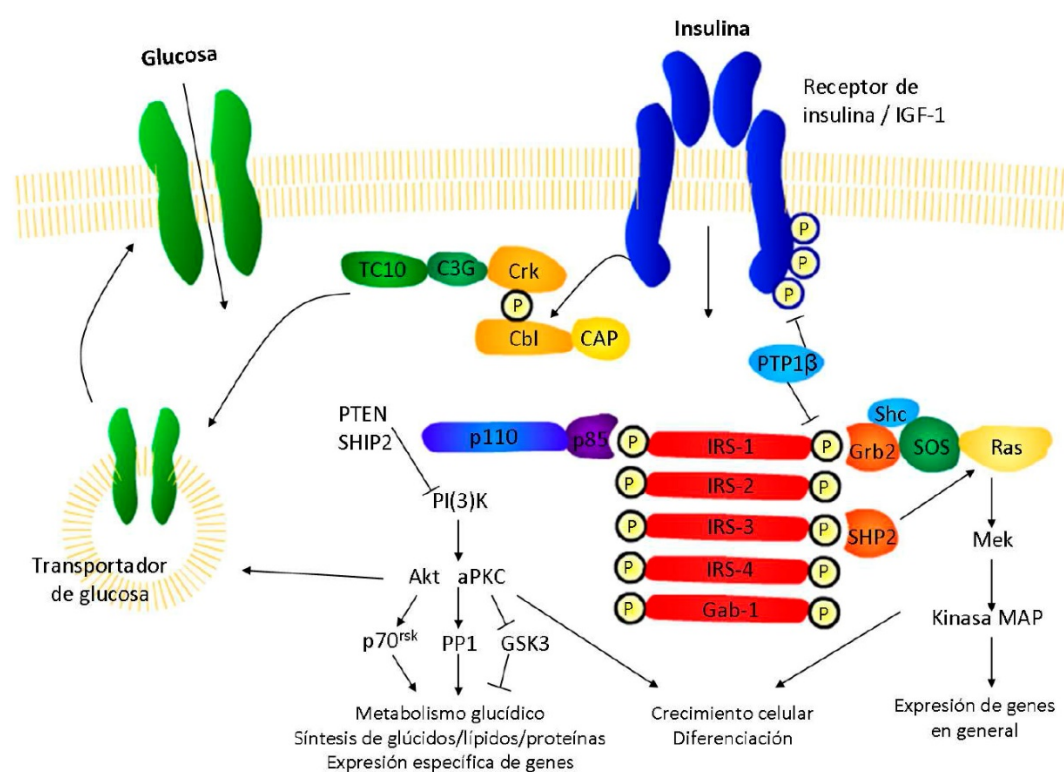
**Figura 4.** Esquemas de los procesos de lipogénesis y lipólisis. Ácidos grasos libres, FFA; ácidos grasos unidos a CoA, FFA-CoA; glicerol-3-fosfato, G3P; glicerol-3-fosfato aciltransferasa, GPAT; acilCoA acilglicerol-3-fosfato aciltransferasas, AGPAT; ácido fosfatídico, PA; fosfohidrolasa, PAP2; monoglicéridos, MGL diglicéridos, DAG; diacilglicerol aciltransferasa, DGAT; triglicéridos, TAG; fosfoenolpiruvato carboxiquinasa; PEPCK; ATP-citrato liasa, ACLy; acetil-CoA carboxilasa, ACC; sintasa de ácidos grasos, FAS; lipasa de triglicéridos del tejido adiposo ATGL; lipasa sensible a hormonas, HSL. Modificado de Saponaro *et al.*, 2015.

## 1.4. Insulina

La insulina es la hormona anabólica más importante que actúa sobre el tejido adiposo. Promueve el almacenaje y la síntesis de carbohidratos, lípidos y proteínas e inhibe su degradación (Saltiel y Kahn, 2001). La insulina estimula el proceso de diferenciación de pre-adipocitos en adipocitos. En adipocitos, la insulina estimula la captación de ácidos grasos y de glucosa, siendo esta última utilizada para la síntesis del glicerol necesario para la esterificación y almacenamiento de los ácidos grasos en forma de TAGs (Ducharme y Bickel, 2008; Kraemer *et al.*, 2013). Por otro lado, la insulina es un potente inhibidor de la lipólisis, lo que favorece de forma indirecta el almacenamiento de lípidos y disminuye los niveles circulantes de ácidos grasos (Czech *et al.*, 2013).

La unión de la insulina a su receptor (IR) provoca su autofosforilación y activación, lo que conduce a la unión y fosforilación mediada por este receptor tirosina quinasa de los sustratos del receptor de insulina (IRS), y de los adaptadores Cbl y Shc (Pessin y Saltiel, 2000; White, 2003). Las proteínas IRS poseen hasta 20 sitios potenciales de fosforilación en tirosina que, al ser activados por el IR, sirven de sitios de unión para proteínas efectoras intracelulares con dominios SH2 (*Src homology 2*), tales como la proteína Grb2, las Tyr quinasas citoplasmáticas Fyn y Csk, y la subunidad reguladora (p85) de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K). La interacción de IRS fosforilado y Shc con Grb2 activa la ruta Ras/MAPK, que media los efectos mitogénicos de la insulina (Bevan, 2001). Por su parte, la interacción entre dos dominios SH2 de la subunidad p85 de la PI3K y el IRS fosforilado induce el reclutamiento y activación de la subunidad catalítica (p110) de PI3K, dando lugar entonces a la formación de fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3) a partir del PIP2 presente en la membrana plasmática. Esto crea sitios de reconocimiento para proteínas con dominios de tipo pleckstrina (PH), como las quinasas de serina/treonina PDK1 y Akt/proteína quinasa B (PKB) (Kanzaki, 2006; Pessin y Saltiel, 2000). Esto facilitado la interacción de Akt con sus reguladores, PDK1 y el complejo mTOR-Rictor (Hresko y Mueckler, 2005; Kanzaki, 2006), lo que provoca la fosforilación de Akt en Thr-308 y Ser-473, respectivamente, y su activación (Fig. 5).

La quinasa Akt es el principal mediador de las acciones metabólicas de la insulina. Entre las dianas de la Akt está AS160/TBC1D4, una proteína activadora (i.e., Rab GAP; ver apartado 1.10.) de las GTPasas de bajo peso molecular, Rab (Manning y Cantley, 2007; Sano *et al.*, 2007). Concretamente, la fosforilación de AS160 mediada por Akt provoca la activación de su actividad GAP, lo que conlleva la activación de varias proteínas Rab relacionadas con el tráfico del transportador de glucosa GLUT4 hacia la membrana plasmática (Kanzaki, 2006; Tan *et al.*, 2012). Por otro lado, Akt también actúa sobre la proteína tuberina (TSC2), que forma entonces un complejo con hamartina (TSC1), y el complejo TSC1/2 resultante provoca la activación del complejo mTOR-Raptor (mTORC1) (Huang y Manning, 2009). A su vez, el complejo mTORC1 estimula la lipogénesis y el almacenamiento de lípidos en adipocitos, además de suprimir la lipólisis mediante su efecto inhibitorio sobre la expresión de la lipasa asociada a las GLs, ATGL/desnitrina (Chakrabarti *et al.*, 2010).



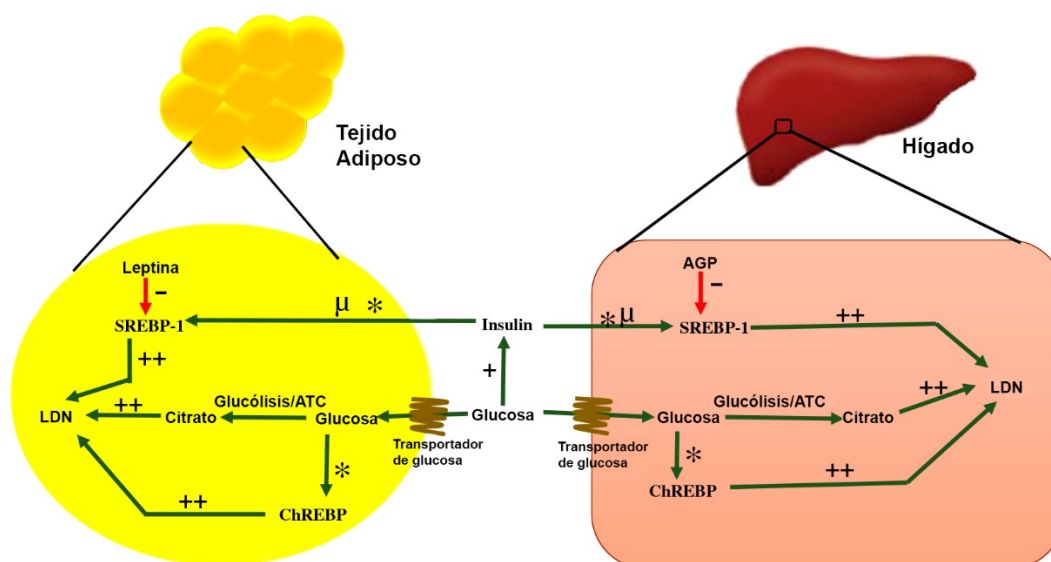
**Figura 5.** Señalización intracelular de la insulina. La insulina estimula a nivel intracelular diferentes rutas de señalización que activan, entre otras funciones, la actividad lipogénica celular, la captación de glucosa, la síntesis de proteínas y diferenciación celular, además de inhibir la actividad lipolítica (Modificado por Pulido, 2011, a partir de Saltiel, 2001).

Respecto a su acción estimuladora de la lipogénesis, entre otras acciones, la insulina estimula la entrada de ácidos grasos en los adipocitos en un proceso que está mediado por FAT/CD36 (Lafontan, 2008), que se acumula en caveolas especialmente en respuesta a insulina (Thompson *et al.*, 2010). Una vez en el interior, los ácidos grasos son activados mediante su esterificación con coenzima A (CoA), en un proceso mediado por las acil-CoA sintasas (ACS; ACSL1, ACSL3 y ACSL4) (Ellis *et al.*, 2010). Los ácidos grasos activados son procesados por dos enzimas ubicadas en el retículo endoplásmico, la glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT), que genera el sustrato de la sn-1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferasa (AGPAT), el ácido lisofosfatídico, dando lugar a ácido fosfatídico. Finalmente, la fosfatasa del ácido fosfatídico (PAP/lipin) cataliza la formación de DAGs que, mediante la acción de las enzimas diacilglicerolaciltransferasas (DGAT), darán lugar a los TAGs que se almacenan en las GLs.

La formación de mono-, di- y triglicéridos (MAG, DAG y TAG, respectivamente) requiere glicerol, concretamente glicerol-3-fosfato (G3P), para la esterificación sucesiva de los ácidos grasos. En adipocitos, el G3P puede ser sintetizado por dos procesos. Por una parte, a partir de la glucosa captada en respuesta a insulina; concretamente, uno de los intermediarios de la ruta glucolítica, dihidroxiacetona-3-fosfato (DHAP), se reduce a G3P mediante la acción de la enzima glicerol-3-fosfato dehidrogenasa. Por otra parte, tanto la DHAP como el G3P pueden sintetizarse a partir de sustratos como piruvato, aminoácidos o intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) mediante el proceso de gliceroneogénesis, que ocurre en tejido adiposo e hígado en periodos de ayuno como fuente para la síntesis de TAGs (Hanson y Reshef, 2003). Este mecanismo sirve además para la re-esterificación de los ácidos grasos derivados de la lipólisis, lo que en tejido adiposo humano puede suponer hasta el 40% (Reshef *et al.*, 2003). El G3P producido por alguna de estas vías es esterificado y acilado, tanto en el retículo endoplásmico como en la mitocondria, para dar ácido lisofosfatídico y ácido fosfatídico, que es finalmente utilizado para la síntesis de TAGs (Franckhauser *et al.*, 2002; Owen *et al.*, 2002). En la gliceroneogénesis juega un papel fundamental la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), cuya eliminación en el tejido adiposo se asocia con el desarrollo de lipodistrofia (Franckhauser *et al.*, 2002).

## 1.5. Lipogénesis *de novo*

Además de a partir de los ácidos grasos de la dieta, la síntesis de TAGs puede producirse mediante el proceso de lipogénesis *de novo*. Este proceso, que habitualmente se ha asociado al hígado tras la ingesta de dietas ricas en carbohidratos, ocurre también en el tejido adiposo (Lodhi *et al.*, 2011; Ameer *et al.*, 2014; Saponaro *et al.*, 2015). En esta ruta, el ácido cítrico producido en el TCA es convertido, por la acción de la enzima ATP-citrato liasa (ACLY), a acetil-CoA que, a su vez, genera malonil-CoA mediante la enzima acetil-CoA carboxilasa (ACC/ACACA). Por último, malonil-CoA es el sustrato de la sintasa de ácidos grasos (FAS) para la generación de ácidos grasos, palmitato en particular, a partir del cual se producen otros ácidos grasos por diferentes mecanismos (i.e., ácido esteárico por elongación del palmitato, y ácido palmitoleico y ácido oleico por desaturación del ácido palmítico y esteárico, respectivamente) (Fig. 6) (Lodhi *et al.*, 2011; Saponaro *et al.*, 2015). En presencia de glucosa, se produce la inducción de los enzimas lipogénicos mediante la activación de los factores de transcripción SREBP-1 (*sterol regulatory element-binding protein-1*) (en respuesta a insulina) y ChREBP (*carbohydrate responsive element-binding protein*) (Ameer *et al.*, 2014).



**Figura 6.** Regulación nutricional y hormonal de la síntesis *de novo* de ácidos grasos en tejido adiposo (izquierda) e hígado (derecha). LDN, lipogénesis *de novo*; SREBP-1, proteína de unión del elemento regulador de esteroles-1; ChREBP, proteína de unión del elemento sensible a carbohidratos; AGP, ácidos grasos poliinsaturados; +, baja estimulación; ++, alta estimulación; -, disminución transcripcional; μ, estimulación transcripcional; \*, activación postraduccional. Tomado de Ameer *et al.*, 2014

## 1.6. Lipolisis

La lipolisis es una ruta catalítica que promueve la movilización de energía desde el tejido adiposo hasta tejidos periféricos en respuesta a la demanda de energía. Este proceso está regulado por varias señales hormonales, principalmente catecolaminas y péptidos natriuréticos (revisado en Malagón *et al.*, 2013; Frühbeck *et al.*, 2014).

La lipolisis es el proceso por el cual los TAGs son hidrolizados, resultando en ácidos grasos y glicerol que son liberados a la circulación. La hidrólisis de los TAGs se lleva a cabo en varios pasos mediante la acción de lipasas (Fig.7). El primer paso se lleva a cabo por la lipasa de triglicéridos de tejido adiposo (ATGL o desnutrina), que hidroliza los TAGs generando DAGs y liberando un ácido graso (Ducharme y Bickel, 2008). Posteriormente, los DAGs son convertidos en MAGs por acción de la lipasa sensible a hormonas (HSL), lo que genera un nuevo ácido graso. Finalmente, los MGL son completamente hidrolizados por acción de la enzima lipasa de monoglicéridos (MGL), generando un nuevo ácido graso y glicerol (Fredrikson *et al.*, 1986; Frühbeck *et al.*, 2014).

Las catecolaminas, tras su unión a receptores  $\beta$ -adrenérgicos, acoplados a proteínas Gs, activan la adenilato ciclasa (AC), que aumenta los niveles intracelulares de AMPc y, con ello, activan la proteína quinasa A (PKA) (Razani y Lisanti, 2001) que, entre otros sustratos, fosforila una de las proteínas asociadas a las gotas lipídicas (GLs), la perilipina-1 (PLIN1) la cual, en condiciones basales está unida a la proteína CGI-58, que es un coactivador de la ATGL. La liberación de CGI-58 tras la fosforilación de PLIN permite su interacción con la ATGL, que puede así actuar sobre los TAGs almacenados en las GLs (Granneman *et al.*, 2007; Yamaguchi *et al.*, 2007; Nielsen *et al.*, 2014; Frühbeck *et al.*, 2014). Además, la PKA fosforila también a la HSL que entonces se transloca, junto con la chaperona de lípidos FABP4, desde el citosol a la superficie de las GLs, donde interacciona con PLIN1 y promueve la hidrólisis de los lípidos almacenados en éstas (Brasaemle *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2007).

La lipolisis se detiene mediante la hidrólisis de AMPc por fosfodiesterasas, lo que hace que CGI-58 se disocie de ATGL y se una a PLIN1, además de promover la

vuelta de HSL al citosol (Lafontan y Langin, 2009). En este contexto, la acción anti-lipolítica de la insulina reside en la activación vía Akt de la fosfodiesterasa 3B (PDE), reduciendo con ello los niveles de AMPc inducidos por catecolaminas (Lafontan y Langin, 2009). Además, la insulina también actúa sobre la proteína fosfatasa 1, que desfosforila la HSL (Jaworski *et al.*, 2007).

## 1.7. Gotas lipídicas

Las GLs son estructuras complejas y altamente dinámicas que, como se mencionó anteriormente, tienen un papel central en la gestión de los recursos energéticos (Fujimoto y Parton, 2011; Thiam *et al.*, 2013). Además, cumplen otras muchas funciones, incluyendo el almacenamiento y degradación de proteínas, la producción de moléculas derivadas de lípidos, la síntesis de membranas, la replicación viral o la protección frente a bacterias (Ducharme y Bickel, 2008; Fujimoto *et al.*, 2008; Kohlwein *et al.*, 2013; Barbosa *et al.*, 2015; Kory *et al.*, 2016). Por otra parte, los lípidos neutros almacenados en las GLs proporcionan un tampón que permite el flujo de energía y constituyen además un depósito de los precursores de los lípidos de membrana. El exceso o la deficiencia de almacenaje de lípidos neutros en las GLs está relacionado con el desarrollo de enfermedades metabólicas como la lipodistrofia, la enfermedad de hígado graso no-alcohólico (NAFLD), aterosclerosis, y obesidad/diabetes tipo 2 (T2D) (Guilherme *et al.*, 2008; Kraemer *et al.*, 2013; Konige *et al.*, 2014; Kory *et al.*, 2016).

Las GLs, que se encuentran presentes en muchos tipos celulares, tienen forma redondeada y diámetro variable, que puede alcanzar hasta 100  $\mu\text{m}$  en adipocitos blancos. Las GLs están constituidas por un núcleo de lípidos neutros, como se mencionó anteriormente, principalmente TAGs (en adipocitos blancos), ésteres de colesterol, ésteres de retinol y colesterol (Fujimoto y Parton, 2011; Walther y Farese, 2012; Thiam *et al.*, 2013). Este núcleo hidrofóbico está rodeado por una monocapa de fosfolípidos a la que se asocian una gran variedad de proteínas, más de 300 atendiendo a los estudios proteómicos de GLs aisladas (Brasaemle *et al.*, 2004; Olofsson *et al.*, 2008; Fujimoto y Parton, 2011; Reue *et al.*, 2011; Walther y Farese,

2012; Yang *et al.*, 2012; Na *et al.*, 2013; Rabanal-Ruiz, 2014). Entre éstas, hay proteínas responsables de la activación de los ácidos grasos, como ACSL3, así como el resto de enzimas que completan la ruta de síntesis de TAGs (GPAT4, AGPAT3, PAP y DGAT2) (Kuerschner *et al.*, 2008; Stone *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011; Wilfling *et al.*, 2013). Las GLs tienen también asociadas a su cubierta las lipasas HSL y ATGL cuya actividad, como se ha descrito anteriormente, está regulada por PLIN1. PLIN1 forma parte de una familia, las perilipinas o PLIN1-5 (anteriormente denominadas perilipina 1, ADRP, TIP47, S3-12 y OXPAT) (Kimmel *et al.*, 2010; Konige *et al.*, 2014; Sztalryd y Kimmel, 2014; Kimmel y Sztalryd, 2016).

Entre ellas, sólo PLIN1 (o PLIN) se asocia a las GLs de forma constitutiva (Wolins *et al.*, 2006). En concreto, PLIN se expresa en tejido adiposo (blanco y marrón) y células estroídogénicas y regula tanto la lipogénesis como la lipólisis (Kimmel y Sztalryd, 2016). En particular, promueve la lipogénesis en condiciones basales porque protege a las GLs de la acción de las lipasas mientras que, como se ha comentado en apartados anteriores, tras su fosforilación inducida por la estimulación de la lipólisis, permite el acceso de las lipasas a las GLs y la hidrólisis de los TAGs almacenados en éstas (Kimmel y Sztalryd, 2016).

Respecto al resto de perilipinas, que se asocian a las GLs en respuesta a estímulos, PLIN2 y PLIN3 presentan una distribución tisular amplia, mientras que PLIN4 se expresa en adipocitos, cerebro, corazón, y músculo esquelético, y PLIN5 está en tejidos con alta actividad de oxidación de ácidos grasos, como corazón, TAM y músculo esquelético (revisado por Kimmel y Sztalryd, 2016). En relación a sus funciones, PLIN2 y PLIN3 regulan la hidrólisis de los lípidos almacenados en GLs de células no adipocitarias; concretamente, PLIN2 protege del acceso de ATGL-CGI-58 a las GLs, reduciendo la lipólisis basal, y junto con PLIN3, actúan como barrera impidiendo la fusión de las GLs con autofagosomas (revisado por Kimmel y Sztalryd, 2016). Se ha propuesto que PLIN5 también protege de la lipólisis interfiriendo en la interacción entre ATGL y su activador CGI-58. Por su parte, se ha propuesto que PLIN4 promueve el almacenamiento de lípidos y estabilización de las GLs en formación (Brasaemle, 2007). Esta última perilipina, junto con PLIN2, que también se asocia a las GLs en formación, son sustituidas por PLIN1 durante el crecimiento y maduración de éstas (Wolins *et al.*, 2005).



Además de perilipinas, las GLs también tienen asociadas las proteínas de la familia CIDE (*cell death-inducing DFFA-like effector*), que presentan regiones de homología con PLIN1: Cidea, expresada fundamentalmente en adipocitos marrones, Cideb en hígado, y Cidec/Fsp27 en adipocitos blancos (revisado en Konige *et al.*, 2014). Se ha demostrado que esta última regula tanto la lipólisis basal como la estimulada entre otros mecanismos mediante su interacción con ATGL, inhibiendo la acción lipolítica de esta enzima y promoviendo así el almacenamiento de TAGs (Grahm *et al.*, 2014). Además, Fsp27 y Cidea promueven la agrupación de GLs, localizándose en los puntos de contacto entre GLs y facilitando así la transferencia de lípidos desde las GLs más pequeñas a las GLs más grande, con un crecimiento neto del tamaño de las GLs (Konige *et al.*, 2014; Barneda *et al.*, 2015).

Otras proteínas presentes en la cubierta de las GLs incluyen enzimas relacionadas con la síntesis de fosfolípidos, como ACSL1 y CCT $\alpha$  (Krahmer *et al.*, 2011; Pol *et al.*, 2014). De todas formas, las GLs requieren del suministro de fosfolípidos y/o sus intermediarios sintetizados en otros orgánulos, como el retículo endoplásmico y las mitocondrias (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina) y los peroxisomas (éter-lípidos) (Bartz *et al.*, 2007; Penno *et al.*, 2013; Pol *et al.*, 2014).

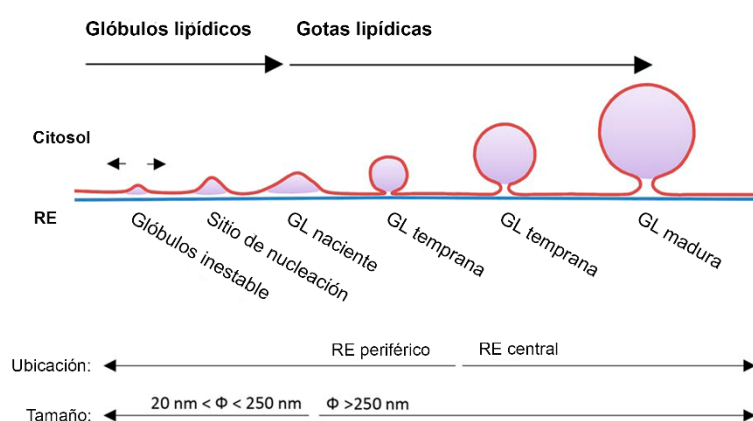
De hecho, en las células se establece una interacción física y cooperativa entre las GLs y estos orgánulos celulares para la síntesis de los fosfolípidos que forman la cubierta de las GLs así como para facilitar otras funciones compartidas, que se desglosan en los siguientes apartados (Walther y Farese, 2012; Barbosa *et al.*, 2015; Gao y Goodman, 2015; Kory *et al.*, 2016). Estas interacciones, y el propio transporte de las GLs, está mediado por diversos tipos de proteínas asociadas a la cubierta de estos orgánulos, incluyendo componentes del citoesqueleto, GTPasas de las familias Rab y Arf y proteínas SNARE (Barbosa *et al.*, 2015; Gao y Goodman, 2015; Kory *et al.*, 2016).

### **1.7.1. Relación de las gotas lipídicas con otros orgánulos celulares**

#### **1.7.1.1. Retículo endoplasmático**

Entre las interacciones de las GLs con otros orgánulos destaca la que establecen con el retículo endoplásmico, ya que este último es el orgánulo a partir

del cual se originan las GLs (Fig. 7) (revisado en Ploegh, 2007; Pol *et al.*, 2014; Barbosa *et al.*, 2015; Hashemi y Goodman, 2015; Kory *et al.*, 2016; Mishra *et al.*, 2016). Se han propuesto varios modelos de formación de GLs a partir del RE. El más aceptado propone que los lípidos neutros sintetizados mediante las enzimas residentes en el retículo endoplásmico se acumulan entre las dos capas de la bicapa lipídica en dominios especializados de este orgánulo, produciéndose la curvatura de la capa citosólica del RE y la formación final de una gota que emerge a partir de dicho lado de la membrana (Hashemi y Goodman, 2015; Pol *et al.*, 2014). En este proceso intervienen fosfolípidos y proteínas específicas, como PLIN3, que se une a las GLs en crecimiento sobre la superficie del RE y parece promover o estabilizar la curvatura de la capa citosólica del RE, DGAT2, que trafica entre el RE y las GLs, o seipin, que interacciona y activa a GPAT (Hashemi y Goodman, 2015; Pagac *et al.*, 2016).



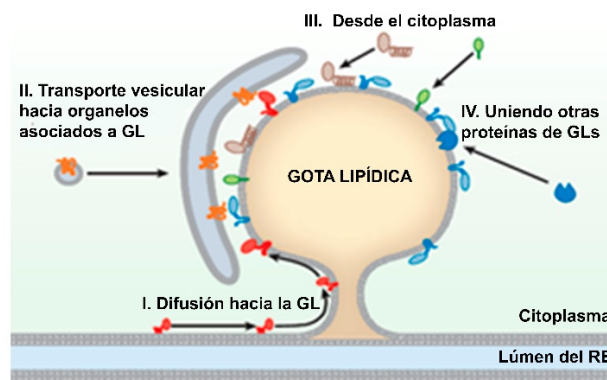
**Figura 7.** Formación de las GLs a partir de zonas especializadas del RE donde se acumulan los TAGs, empezando como GL naciente hasta formar una GL madura. Tomado de Pol *et al.*, 2014.

Una cuestión aún no resuelta totalmente es si las GLs se forman en sitios concretos del RE o al azar (Hashemi y Goodman, 2015). En estudios de adipogénesis se ha observado que las GLs se forman habitualmente en la periferia, donde el retículo está más disperso, y posteriormente migran hacia el núcleo (Pol *et al.*, 2014). Mediante el uso de construcciones de secuencias de destino al RE y a GLs, se ha observado que éstas se concentran formando *puncta* sobre regiones concretas del RE, donde se acumulan los lípidos tras la exposición de las células a ácidos grasos (i.e., ácido oleico) formando las denominadas pre-GLs que contienen la acil-CoA sintasa

ACSL3 (Kassan *et al.*, 2013). Se ha propuesto que este proceso está controlado por los lípidos (como diacilglicerol) y proteínas (como FIT2, que se une TAGs) de la membrana del RE y por factores citosólicos, como PLIN2 y PLIN3, que facilitan la salida de las GLs actuando como coatómeros (Pol *et al.*, 2014; Hashemi y Goodman, 2015). Finalmente, las pre-GLs forman GLs maduras presumiblemente gracias a la acción de seipin, que organiza un complejo molecular en el RE que permite la transferencia de los TAGs al interior de las GLs en crecimiento (Wang *et al.*, 2016).

Una vez formadas, las GLs pueden aumentar de tamaño bien mediante la síntesis de TAGs en la propia GL, ya que las GLs presentan varias enzimas lipogénicas asociadas a su superficie (ver apartado 3), originando las denominadas GLs en expansión (Kory *et al.*, 2016), o bien mediante la fusión de GLs que van gemando desde el RE o la transferencia de lípidos de unas GLs a otras mediante la acción de Fsp27 (Walther y Farese, 2012; Barbosa *et al.*, 2015; Kory *et al.*, 2016). Se ha postulado que, una vez formadas, las GLs se mantienen unidas al RE de manera constante a través de puentes membranosos que permiten el intercambio de lípidos (incluidos fosfolípidos) y proteínas entre ambos compartimentos, como GPAT4 y DGAT2, que contienen motivos de tipo horquilla que permiten su inserción en membrana (Jacquier *et al.*, 2011; Kory *et al.*, 2016) (Fig. 8). La formación de estos puentes membranosos parecen depender de la maquinaria Arf1/COPI (ver más adelante) (Wilfling *et al.*, 2014; Kory *et al.*, 2016). No obstante, algunas enzimas como GPAT4 sólo trafican desde el RE a una subpoblación de GLs, por lo que presumiblemente no todas estarían directamente conectadas con el RE, aparte del hecho de que las GLs viajan en el citosol a través de la red de citoesqueleto y, por tanto, independientemente del RE (Hashemi y Goodman, 2015). De todas formas, todos los estudios llevados a cabo hasta el momento demuestran que las GLs están siempre más o menos próximas a las membranas del RE.

Aparte de a través de puentes membranosos entre RE-GLs, se han propuesto otras vías de transporte de las proteínas a la superficie de las GLs (Kory *et al.*, 2016).



**Figura 8.** Mecanismos por los cuales las proteínas pueden alcanzar la superficie de las GLs o membranas adyacentes. RE, retículo endoplásmico; GL, gota lipídica. Tomado de Walther y Farese, 2012.

Así, las GLs pueden recibir proteínas del RE a través de transporte vesicular (Walther y Farese, 2012; Hashemi y Goodman, 2015; Kory *et al.*, 2016). En concreto, se ha observado que COPI, que forma la cubierta de las vesículas que atraviesan el aparato de Golgi y retornan proteínas cargo al retículo endoplásmico (i.e., transporte retrógrado), es importante para la llegada de la lipasa ATGL a las GLs, en un proceso que parece depender de la GTPasa Arf1 y su activador GBF1 (Soni *et al.*, 2009; Ellong *et al.*, 2011). Las vesículas transportadoras de estas proteínas procederían de los sitios de salida del RE (*ER exit sites*) (Walther y Farese, 2012). Más aún, se ha visto que COPI y Arf1 podrían estar involucrados en el tráfico de proteínas desde las GLs a otros orgánulos (Hashemi y Goodman, 2015).

Finalmente, algunas proteínas de las GLs parecen alcanzarlas directamente del citosol, como es el caso de las perilipinas, CCT $\alpha$  o Cidea, que se insertan a las GLs mediante hélices anfipáticas, mediante anclajes lipídicos, como Rab18, o bien interactúan con otras proteínas ancladas a las GLs, como HSL y PLIN1 (Walther y Farese, 2012; Kory *et al.*, 2016).

### 1.7.1.2. Mitocondrias

Las mitocondrias cumplen varias funciones relacionadas con el metabolismo lipídico. En primer lugar, catalizan la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos de cadena media y larga para obtener acetil-CoA, que es utilizado para la producción de ATP y como

sustrato para otras reacciones anabólicas (Schrader y Yoon, 2007). Además, las mitocondrias llevan a cabo la reutilización de ácidos grasos y participan en la síntesis de fosfolípidos de membrana (Penno *et al.*, 2013). Estas funciones residen en parte en el contacto directo que se establece entre GLs y mitocondrias, que se ha descrito en células como adipocitos y hepatocitos (revisado por Gao y Goodman, 2015; Barbosa *et al.*, 2015). Concretamente, esta asociación permite la transferencia de ácidos grasos desde las GLs hacia las mitocondrias, en donde serían utilizados para generar energía mediante  $\beta$ -oxidación (Vock *et al.*, 1996; Herms *et al.*, 2015). De hecho, se ha descrito una mayor interacción GLs-mitocondrias tras la estimulación de la lipólisis en adipocitos (Tarnopolsky *et al.*, 2007). Igualmente, estudios recientes en fibroblastos en condiciones de privación de nutrientes muestran que el establecimiento de contactos mitocondrias-GLs es especialmente importante en condiciones de ayuno, en las que los lípidos de las GLs son hidrolizados por lipasas citosólicas, las mitocondrias se acercan a las GLs y se fusionan entre ellas, garantizando una actividad oxidativa máxima y evitando al mismo tiempo la potencial lipotoxicidad derivada de la liberación de ácidos grasos (Rambold *et al.*, 2015). Se ha propuesto que en esta interacción interviene la PLIN5 unida a la superficie de las GLs y que, al menos en algunos tipos celulares, también parece localizarse en las mitocondrias (Gao y Goodman, 2015)

De forma recíproca, las mitocondrias del tejido adiposo y del hígado proporcionan intermediarios clave para la síntesis de TAGs. Así, el ciclo de Krebs proporciona sustratos para la síntesis de ácidos grasos, mientras que el G3P generado en la gliceroneogénesis es esterificado y acilado tanto en RE como en mitocondria para generar intermediarios de la síntesis de TAGs (Owen *et al.*, 2002; Franckhauser *et al.*, 2002). Además, la activación de los ácidos grasos de cadena media ocurre en la matriz mitocondrial. La mitocondria también produce acetil-CoA, que puede ser utilizado para la síntesis de ácidos grasos.

### **1.7.1.3. Peroxisomas**

Los peroxisomas poseen cerca de 60 enzimas relacionadas con el metabolismo lipídico (Hunt *et al.*, 2012) e integran varias rutas del metabolismo

lipídico, incluyendo  $\alpha$  y  $\beta$  oxidación de ácidos grasos de cadena muy larga o ramificados o la biosíntesis de éter-fosfolípidos y ácidos biliares (van Roermund *et al.*, 2000; Wanders *et al.*, 2007). Se ha propuesto que los contactos gotas lipídicas-peroxisomas facilitan el acoplamiento de la lipólisis en las gotas a la oxidación de los ácidos grasos en el peroxisoma (Binns *et al.*, 2006; Barbosa *et al.*, 2015; Gao y Goodman, 2015). De manera recíproca, los peroxisomas podrían proporcionar los éter-fosfolípidos (incluidos plásmalogenos) que forman parte de las cubiertas de las gotas (Kohlwein *et al.*, 2013; Lodhi y Semenkovich, 2014; Barbosa *et al.*, 2015).

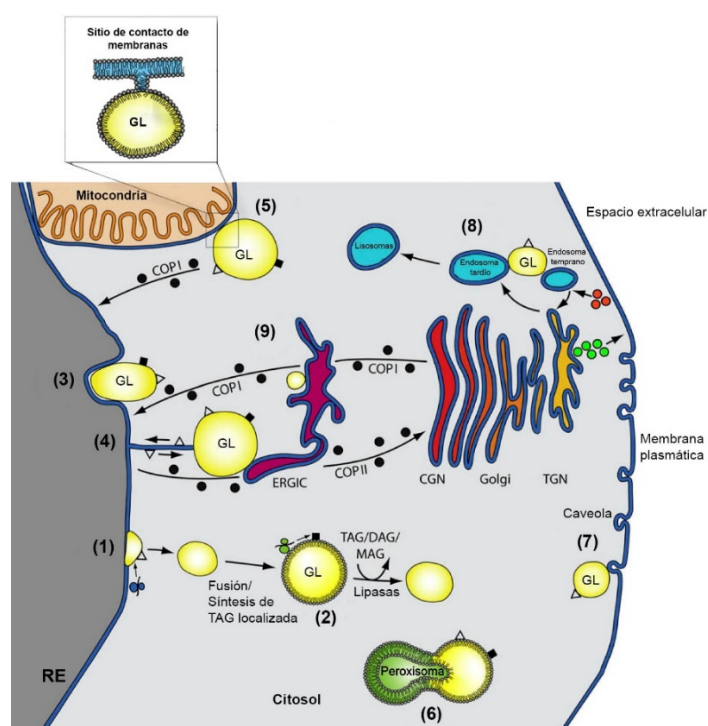
Estudios recientes de nuestro laboratorio sobre la GTPasa de bajo peso molecular Rab18, que se ha demostrado de forma consistente que se asocia a GLs en adipocitos (Ozeki *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2005; Pulido *et al.*, 2011), muestran que Rab18 en las gotas interacciona con mitocondrias y peroxisomas en respuesta a insulina y al agonista  $\beta$ -adrenérgico isoproterenol, regulando además tanto la actividad CPT-1 mitocondrial (i.e., importación de ácidos grasos a la mitocondria) como la actividad catalasa (adscrita a peroxisomas en adipocitos), sugiriendo un papel para esta GTPasa en la interacción entre GLs y estos orgánulos para facilitar la transferencia y oxidación de los ácidos grasos almacenados en las GLs (Rabanal-Ruiz, 2014)

#### 1.7.1.4. Endosomas

Algunos estudios sugieren la existencia de una interacción funcional entre las GLs y los endosomas y que esta interacción juega un papel importante del tráfico de membrana. Mediante estudios de microscopía electrónica se ha observado que en células cargadas con lipoproteínas de alta densidad (HDL), los endosomas están en estrecho contacto con las GLs (Zehmer *et al.*, 2009). Esta interacción podría estar mediada por las GTPasas Rab5 y Rab11, ya que se ha descrito la presencia de estas proteínas típicamente endosomales en la superficie de las GLs (Liu *et al.*, 2007). Más aún, las GLs son también capaces de reclutar una proteína de tipo *long coiled-coil*, el antígeno 1 de endosomas temprano (EEA1), que es un efector de Rab5, y la eliminación de las proteínas Rab celulares mediante un inhibidor de estas GTPasas,

RabGDI, impide la asociación de las GLs y los endosomas (Liu *et al.*, 2007; Zehmer *et al.*, 2009; Gao y Goodman, 2015).

Se ha propuesto que la interacción endosomas-GLs podría ser importante para dirigir las GLs a los lisosomas para la producción de colesterol mediante autofagia en macrófagos (Ouimet *et al.*, 2011). Además, el transporte de CAV1 hacia la superficie de las GLs así como el transporte de colesterol y de proteínas de unión a ácidos grasos (FABPs) que normalmente residen en caveolas, parece ocurrir a través de endosomas (Fig. 9) (Goodman, 2008).



**Figura 9.** Esquema de interacción de GLs con varios orgánulos. La biogénesis de GLs incluye el proceso de gemación a partir del RE en forma de vesículas (1) o mediante la formación de las denominadas "egg cup" (3). Los puentes que conectan las membranas de RE y GLs (4) pueden proporcionar una vía no vesicular para el tráfico de proteínas y lípidos entre ambos orgánulos. Las GLs aumentan su tamaño por fusión o por síntesis de TAG. Los lípidos almacenados son hidrolizados por lipasas, generando diglicéridos (DAG) o monoglicéridos (MAG) (2) y ácidos grasos libres (FFA) y glicerol. Las proteínas asociadas a GLs son transportadas al RE (1) (ribosoma azul - triángulos) o hacia la superficie de las GLs (2) (ribosoma verde - cuadrado negro). Mitocondrias asociadas a regiones especializadas del RE (*membranas asociadas a mitocondrias* o MAMs), así como a las GLs (5). Interacción de GLs con peroxisomas (6), donde la protusión puede facilitar la transferencia de los ácidos grasos hacia el peroxisoma con el fin de mejorar la eficiencia en la producción de energía. La maquinaria de tráfico intracelular está estrechamente conectada a GLs (9). El compartimento intermedio del aparato de Golgi y el RE, ERGIC, está localizado cerca de las GLs, posiblemente facilitando el intercambio de lípidos y proteínas, presumiblemente por medio de GLs nacientes. Las vesículas COPI y COPII (círculos negros) transportan proteínas y lípidos desde el RE a través de la red *cis* del Golgi (CGN) y viceversa. Las vesículas COP parecen estar relacionadas con la regulación del almacenamiento de lípidos. Los componentes de la maquinaria COPI pueden actuar directamente sobre la superficie de las GLs (5). Las GLs también interaccionan con endosomas tempranos y tardíos (8), así como con caveolas de

adipocitos (7). Abreviaturas: gota lipídica (GL), red *trans* del Golgi (TGN), complejos de proteínas de cubierta I y II (COPI y COPII), triglicéridos (TAG). Los endosomas están representados como círculos rojos y los exosomas como círculos verdes. Modificado de Beller *et al.*, 2010.

#### 1.7.1.5. Aparato de Golgi

El aparato de Golgi se considera como el centro organizador y distribuidor de la ruta secretora, encargado de dirigir la incorporación y el tráfico de las proteínas y lípidos a endosomas, lisosomas, membrana plasmática o exterior celular (Lowe, 2011; Vázquez-Martínez *et al.*, 2012). Está constituido por apilamientos de cisternas aplanadas o dictiosomas situados normalmente en posición yuxtannuclear, que se asocian formando el dominio *Golgi ribbon* (Lowe, 2011). Los apilamientos de cisternas están bordeados en sus extremos por dos redes de estructuras túbulo-vesiculares, la red convexa de entrada *cis* (CGN), que permite el intercambio de proteínas y lípidos con el retículo endoplásmico a través del compartimento intermedio conocido como ERGIC (RE-Golgi), y la red cóncava de salida *trans* (TGN) (Lowe, 2011). De esta forma, la cara *cis* del complejo de Golgi recibe moléculas cargo del RE, las cuales son transportadas y modificadas a través del dictiosoma hasta el TGN (Jackson, 2009). Este transporte anterógrado, que está mediado por vesículas COPII que emergen de zonas específicas de las membranas del RE (*ER exit sites*; ERES) encaradas hacia el *cis*-Golgi y viajan a través del Golgi hasta la TGN, se compensa por un sistema de transporte retrógrado mediado por vesículas COPI que trafican de vuelta desde el TGN, así como desde el ERGIC y el *cis*-Golgi al RE (Vázquez-Martínez *et al.*, 2012). Entre las proteínas características de las vesículas de transporte ER-Golgi e intra-Golgi se encuentran las GTPasas de bajo peso molecular Arf1 (COPI) y Sar1p (COPII), que actúan como adaptadores para la unión de los coatómeros COPI ó COPII durante la gemación de sus vesículas correspondientes (Lowe, 2011; Vázquez-Martínez *et al.*, 2012; Gao y Goodman, 2015).

El aparato de Golgi, junto con la membrana plasmática, constituye uno de los pocos orgánulos que no contactan de forma directa con las GLs (Gao y Goodman, 2015). No obstante, se considera que Golgi y GLs están relacionados funcionalmente vía transporte vesicular (Hesse *et al.*, 2013). Así, las GLs contienen proteínas Rab que median el transporte RE-Golgi, como Rab1, así como componentes de la maquinaria



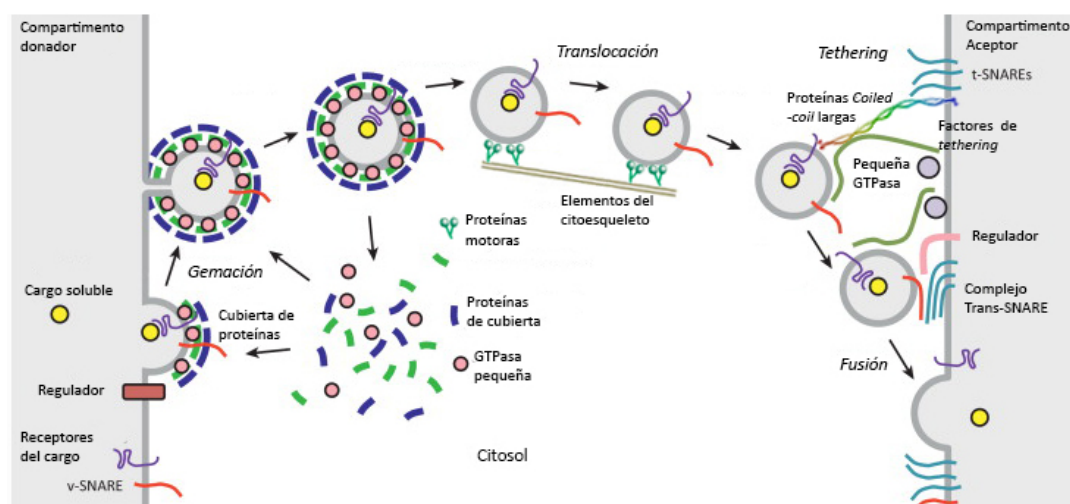
vesicular COPI habitualmente asociados al Golgi, como Arf1 y su activador GBF (i.e., GEF de Arf1) (Bouvet et al., 2013). De esta forma, como se mencionaba en apartados anteriores, se acepta que algunas de las proteínas de las GLs podrían alcanzar éstas vía tráfico vesicular dependiente del aparato de Golgi (Soni et al. 2009; Murphy et al. 2009; Bouvet et al., 2013; Hesse et al., 2013). Concretamente, se ha demostrado que el sistema Arf1/COPI es necesario para el reclutamiento de proteínas asociadas a GLs, como ATGL o PLIN2 (Soni et al., 2009; Nakamura et al., 2004). Así, PLIN2 no se asocia a GLs en presencia de un mutante negativo de Arf1 o de la droga inhibidora de Arf1, brefeldina A (Nakamura et al., 2004), que por otra parte provocan además un aumento del tamaño de las GLs (revisado en Gao y Goodman, 2015). Este aumento en la acumulación de lípidos en respuesta a los tratamientos citados se ha asociado a la observación de que dichos tratamientos impiden la llegada de la lipasa ATGL a las GLs (Beller et al., 2008). Más aún, Soni y colaboradores (2009) han propuesto que la transferencia de ATGL ocurre a través de un mecanismo dependiente de Arf1/COPI en el contexto de la estrecha aposición de las GLs a los ERES y al compartimento ERGIC. En esta línea, estos autores han sugerido la idea de que las cisternas de retículo endoplásmico que rodean a las GLs podrían representar un compartimento para el tráfico vesicular dirigido a las GLs (Soni et al., 2009).

Además de ATGL, otras proteínas que no alcanzan las GLs cuando Arf1 es inhibido incluyen PLIN2 y GPAT4, mientras que otras proteínas de la cubierta, como PLIN3, sí lo hacen (Soni et al., 2009; Wilfling et al., 2014). Por el contrario, el knock-down de subunidades de COPII (o del tercer coatómero vesicular, clatrina) no afecta la morfología ni el metabolismo de las GLs (Beller et al., 2008; Guo et al., 2008; Gao y Goodman, 2015) aunque algunos autores han encontrado que la inhibición de la GTPasa encargada del ensamblaje de los coatómeros COPII, Sar1, puede jugar un papel en la transferencia de ATGL a las GLs, menor en cualquier caso al ejercido por Arf1 (Soni et al., 2009).

## 1.8. Tráfico intracelular

Como se ha explicado en el apartado anterior en relación al sistema de comunicación entre aparato de Golgi y RE (vesículas COPI y COPII), el transporte de proteínas y membranas entre distintos compartimentos celulares y/o con la membrana plasmática está mediado fundamentalmente por intermediarios vesiculares y/o tubulares (Alberts *et al.*, 2002). Este complejo sistema se mantiene gracias al mantenimiento de la direccionalidad y fusión específicas de las vesículas de transporte con su compartimento receptor diana, lo que está mediado por la acción de proteínas de las familias SNARE, GTPasas Rab y Arf, factores de aproximación o de *tethering* y proteínas motoras del citoesqueleto (Fig. 10) (Bonifacino, 2014).

Brevemente, las proteínas SNARE son proteínas integrales de membrana presentes tanto en las membranas de las vesículas que van a fusionarse (*v*-SNARE) como en las membranas del compartimento receptor (*t*-SNARE) (Bonifacino, 2014). Participan en el reconocimiento de membranas compatibles y permiten la fusión de las mismas mediante la formación del complejo SNARE (Hong y Lev, 2014). Por otro lado, las proteínas Rab, que se describen en el apartado 1.10, son GTPasas de la superfamilia Ras, que participan en el control de la interacción de las membranas celulares y el tráfico intracelular (Mizuno-Yamasaki *et al.*, 2011). Como las proteínas Rab, las GTPasas Arf median el reclutamiento de efectores a la superficie de las membranas, incluyendo proteínas de cubierta (Mizuno-Yamasaki *et al.*, 2011). Los factores de *tethering* o de aproximación actúan como intermediarios antes del ensamblaje del complejo SNARE y de la fusión de membranas (Cai *et al.*, 2007; Goud y Gleeson, 2010) (ver apartado siguiente). Por último, las proteínas motoras del citoesqueleto permiten el movimiento direccional de las vesículas sobre la red de filamentos de actina y/o los microtúbulos (van Vliet *et al.*, 2003; Cai *et al.*, 2007).



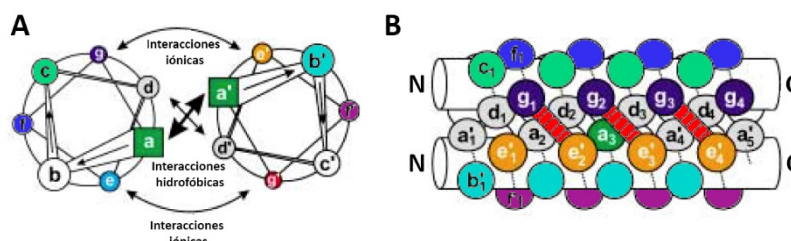
**Figura 10.** Tráfico vesicular. Inicialmente la cubierta recluta componentes proteicos del citosol hacia la membrana del compartimento donador. Así, la membrana que ha comenzado a deformarse empieza a acumular, por un lado, los receptores del cargo a transportar y, por otro, moléculas de v-SNARE. El ensambaje de la cubierta se acompaña de la concentración de cargo en la vesícula en formación, continuada por la gemación y escisión de la vesícula desde el compartimento donador. Posteriormente, la cubierta proteica se desensambla y la vesícula, sin cubierta proteica, se transloca hacia el compartimento aceptor guiada por proteínas motoras a lo largo de elementos del citoesqueleto. Una vez cerca del compartimento aceptor, la vesícula se une a ésta por medio de factores de *tethering* que son reclutados por proteínas Rab localizadas sobre la membrana de la vesícula. Esta unión permite la interacción entre v- y t-SNARE y el anclaje subsiguiente de la vesícula a la membrana del compartimento aceptor. Finalmente, la formación del complejo *Trans-SNARE* promueve la fusión de las bicapas lipídicas de la vesícula y de la membrana del compartimento aceptor. Modificado de Bonifacino, 2014.

## 1.9. Factores de *tethering*

Los factores de *tethering* son heterogéneos en cuanto a su secuencia y estructura, y han sido clasificados en dos grupos: los que forman parte de complejos multiméricos como el complejo COG, el complejo TRAPP o el exocisto, y los que pertenecen a la familia de proteínas con largos dominios *coiled-coil* o proteínas *long coiled-coil* (Guo *et al.*, 2000; Whyte y Munro, 2002; Gillingham y Munro, 2003; Cai *et al.*, 2007; Bröcker *et al.*, 2010).

Las proteínas *long coiled-coil* constituyen una familia de proteínas que no presentan homología de secuencia pero contienen dominios *coiled-coil* de cientos de aminoácidos en su estructura (Rose y Meier, 2004). Los dominios *coiled-coil* están presentes en un 10% de las proteínas del genoma humano (Liu y Rost, 2001). El dominio *coiled-coil* es un motivo estructural caracterizado por poseer entre 2 ó más

$\alpha$ -hélices que se enroscan unas alrededor de las otras formando una superhélice (Cohen y Parry, 1990). Una característica común de la secuencia de los dominios *coiled-coil* es que poseen una repetición de 7 residuos aminoacídicos (*heptad-repeat*; a-b-c-d-e-f-g). Así, los residuos primero (a) y cuarto (d) son hidrofóbicos, mientras que los residuos quinto (e) y séptimo (g) generalmente tienen carga o son polares (Liu et al., 2006; Cohen y Parry, 1990; Yu, 2002; Mason y Arndt, 2004). Esta composición aminoacídica permite que se puedan formar núcleos hidrofóbicos mediante la interacción entre las posiciones a y d generando así la estabilidad del dominio *coiled-coil* (Lau et al., 1984). Por otro lado, las posiciones e y g mantienen interacciones iónicas entre las hélices (Fig. 11). De esta forma, la presencia de dominios *coiled-coil* hacen que las proteínas que las contienen se asocien formando dímeros (homo- o heterodímeros), e incluso oligómeros (Woolfson et al., 2012). Además de promover la dimerización de las proteínas, los dominios *coiled-coil* facilitan la interacción temporal de las proteínas que los contienen con otras proteínas de forma regulada en el tiempo y espacio (Rose y Meier, 2004).

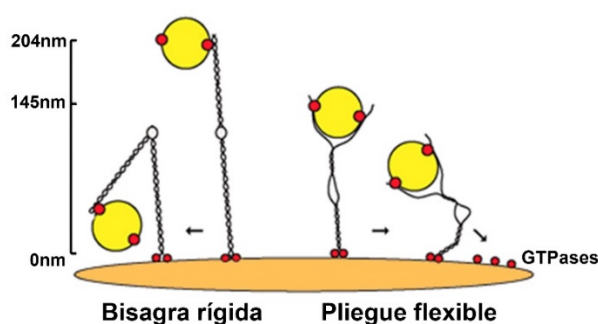


**Figura 11.** Estructura dimérica paralela *coiled-coil*. (A) Vista frontal, desde el extremo amino- hacia el extremo carboxilo-terminal, de dos  $\alpha$ -hélices paralelas. Las posiciones del *heptad repeat* están marcadas desde la a hasta la g y desde la a' hasta la g'. Las posiciones a y d de cada hélice forman el núcleo hidrofóbico entre hélices y las posiciones g y e de cada hélice mantienen interacciones electrostáticas entre las hélices. (B) Vista lateral del diagrama. Los cilindros representan la columna de las hélices (Mason y Arndt; 2004).

La estructura terciaria de las proteínas *coiled-coil* depende de varias características: el número de  $\alpha$ -hélices, que puede variar entre dos y cinco, la orientación de las hélices, que puede ser paralela o antiparalela, las hélices que componen la superhélice, que pueden ser idénticas (homotípicas) o diferentes (heterotípicas), y el sentido de la superhélice, que puede ser hacia la derecha o hacia la izquierda (Hodges, 1996; Lupas, 1996; Malashkevich et al., 1996; Stetefeld et al., 2000; Woolfson et al., 2012). En particular, las proteínas *long coiled-coil* presentan una estructura terciaria en forma fibrilar o de bastón (100 aminoácidos se extienden

en torno a 15 nm) con regiones bisagra flexibles intercaladas entre los dominios *coiled-coil* (Burkhard et al., 2001; Gillingham y Munro, 2003).

Los dominios flexibles de los extremos de las proteínas *long coiled-coil*, que generalmente representan dominios de interacción con las membranas celulares, junto con las regiones bisagra, permiten que estas proteínas ejerzan una gran variedad de funciones, actuando como motores, brazos de rotación, factores de *tethering*, o transportadores de moléculas, vesículas o grandes complejos macromoleculares (Fig. 12) (Rose y Meier, 2004). Con estas características, las proteínas *long coiled-coil* actúan a modo de cables permitiendo la interacción entre membranas, o como proteínas de *scaffolding* para estabilizar y organizar sistemas de membranas (Gillingham y Munro, 2003; Rose y Meier, 2004; Schoch y Gundelfinger, 2006; Hida y Ohtsuka, 2010).



**Figura 12.** Funciones que podrían realizar las proteínas con largos dominios coiled-coil. (A) Como factores de *tethering* de vesículas para acercarlas al orgánulo diana o (B) para el mantenimiento de la estructura de orgánulos intracelulares, como el apilamiento de las cisternas del aparato de Golgi, (C) como componentes estructurales de la matriz de diferentes orgánulos o (D) proteínas de *scaffolding* para el ensamblaje de varios factores. Modificado de (Cheung et al., 2015).

Las proteínas *long coiled-coil* más caracterizadas son las asociadas al aparato de Golgi, las golginas, al que se asocian como proteínas periféricas mediante su asociación a proteínas de la membrana del Golgi (proteínas Rab, GRASP, Arf o Arl), o como proteínas integrales gracias a la presencia de dominios transmembrana en su secuencia (Cheung y Pfeffer, 2016; Gillingham y Munro, 2016). Las golginas, que se asocian a regiones concretas del aparato de Golgi, actúan capturando las vesículas que se acercan a las distintas partes de este orgánulo y mediante la flexión de sus regiones bisagra, permiten la aproximación y posterior anclaje de las vesículas a la membrana receptora (Cheung y Pfeffer, 2016; Gillingham y Munro, 2016). Además,

se ha propuesto que sirven para mantener las membranas del Golgi apiladas (Cheung y Pfeffer, 2016; Gillingham y Munro, 2016).

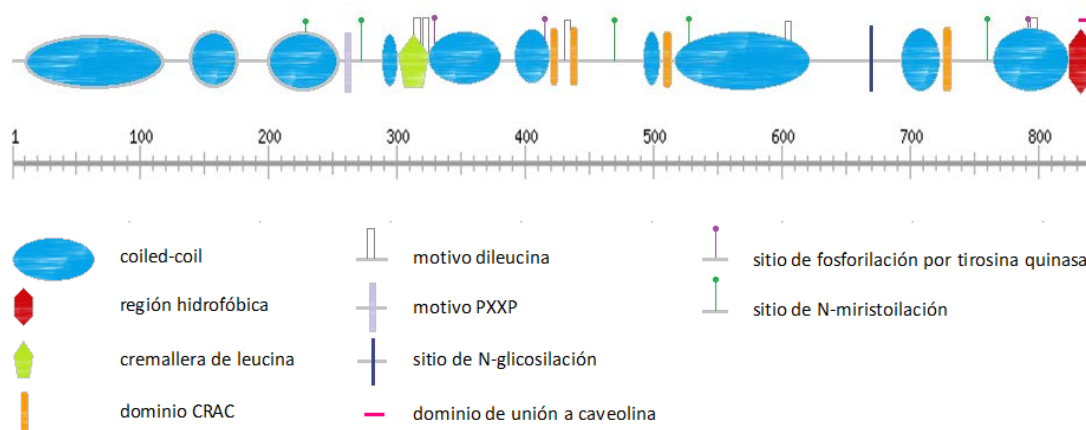
Finalmente, se han identificado proteínas long coiled-coil en la zona activa de la sinapsis, como las proteínas ELKS/CAST/ERC y los miembros de la familia de liprin- $\alpha$ , que forman parte de la citomatriz de esta estructura y se ha propuesto que sirven a modo de andamiajes moleculares (*scaffolds*) para la formación de los complejos moleculares que regulan los procesos de *tethering* y fusión de las vesículas sinápticas con la membrana plasmática (Schoch y Gundelfinger, 2006; ; Hida y Ohtsuka, 2010).

### **1.9.1. Familia de proteínas *long coiled-coil*; NECC1/NECC2/Jakmip1-Marlin1**

Investigaciones previas de nuestro grupo en células endocrinas nos permitieron identificar una nueva proteína *long coiled-coil* a la que denominamos *neuroendocrine long coiled-coil 1* (NECC1) por su expresión específica en células endocrinas y neuronas de vertebrados (Cruz-García et al., 2007). Esta proteína presenta en su secuencia siete regiones de tipo *coiled-coil*, formando un largo dominio *long coiled-coil*, y una región hidrofóbica carboxiloterminale de 19 aminoácidos (Cruz-García et al., 2007). Mediante estudios de inmunolocalización y análisis funcionales determinamos que NECC1 se asocia a las membranas del aparato de Golgi, donde regula el tráfico de proteínas de la ruta de secreción regulada en células neuroendocrinas, por lo que propusimos su clasificación como un nuevo miembro de la familia de las golginas (Cruz-García et al., 2011). Otros autores han identificado esta proteína en

El análisis *in silico* de la secuencia de NECC1 reveló que esta proteína pertenece a una familia que posee dos miembros adicionales. Uno de ellos, denominado Jakmip1/Marlin-1, fue identificado por otros autores en neuronas, en las que regula el tráfico del receptor GABA<sub>B</sub> en relación con la red de microtúbulos, y en órganos linfoides, donde interacciona con quinasas y la red de microtúbulos,

regulando la polarización celular y el tráfico vesicular (Couve *et al.*, 2004; Steindler *et al.*, 2004; Vidal *et al.*, 2007). Finalmente, el tercer miembro de la familia, al que inicialmente denominamos NECC2 por su homología estructural y su expresión en los mismos tejidos que NECC1 (Cruz-García *et al.*, 2007), ha sido caracterizado recientemente en profundidad por nuestro grupo de investigación (Díaz-Ruiz *et al.*, 2013). El análisis *in silico* de la secuencia de NECC2 predijo la presencia de una región hidrofóbica de 19 aminoácidos en su extremo C-terminal, con dos dominios solapados de unión a caveolina (*caveolin-binding domain* o CBD) (Fig. 13) [ $\emptyset$ X $\emptyset$ XXXX $\emptyset$  (aminoácidos 829 al 836), y  $\emptyset$ X $\emptyset$ XXXX $\emptyset$ XX $\emptyset$  (aminoácidos 833 al 843), siendo X cualquier aminoácido, y  $\emptyset$  un aminoácido aromático (Trp, Phe, or Tyr)] (Díaz-Ruiz *et al.*, 2013; Díaz-Ruiz, 2011). Además, presenta 4 dominios CRAC (*cholesterol recognition/interaction amino acid consensus*) y 2 sitios de fosforilación por tirosina quinasas, incluido un sitio específico para Akt (Fig. 13).



**Figura 13.** Análisis de dominios y motivos estructurales de la proteína NECC2 de rata. En la figura se muestran los motivos estructurales y funcionales predichos mediante el uso de diferentes algoritmos bioinformáticos incluidos en el servidor ExPASy, entre los que destacan las 8 regiones *coiled-coil*, los dominios CRAC de unión a colesterol, la región hidrofóbica y el dominio de unión a caveolina, ambos en el extremo carboxilo-terminal. Modificado de Díaz-Ruiz *et al.*, 2013.

En línea con la presencia de dominios de unión a caveolina en la secuencia de NECC2, observamos que en un modelo neuroendocrino, las células de feocromocitoma de rata PC12, esta proteína se distribuye con la proteína CAV1 en caveolas, donde también colocaliza con el receptor del factor de crecimiento nervioso (NGF), receptor TrkA, en un proceso que es estimulado por NGF (Díaz-Ruiz *et al.*, 2013). Además, observamos que NECC2 colocaliza con la actina cortical en

estas células. Estos datos, junto con la observación de que tanto la sobreexpresión como el silenciamiento de NECC2 en las células PC12 alteraba la señalización mediada por este receptor, concretamente la tasa de fosforilación de la MAPK ERK1/2 inducida por NGF, nos llevó a proponer un papel para esta proteína en la regulación de la señalización del sistema NGF/TrkA en caveolas, presumiblemente por su acción como factor de *scaffolding* (Diaz-Ruiz *et al.*, 2013).

Hasta el momento se desconoce si NECC2, o cualquier otro miembro de la familia, están presentes en el tejido adiposo.

## 1.10. Proteínas Rab GTPasas

Las proteínas Rab, que constituyen la familia más amplia de la superfamilia de GTPasas monoméricas Ras, definen la identidad de los orgánulos celulares y son reguladores fundamentales en el tráfico intracelular y en la interacción entre compartimentos celulares en células eucariotas (Stenmark, 2009; Diekmann *et al.*, 2011; Li y Marlin, 2015)

La riqueza en el repertorio de proteínas Rab en las células y las múltiples y fundamentales funciones que cumplen estas proteínas ponen de manifiesto su importancia en el mantenimiento de la fisiología celular. De hecho, alteraciones en proteínas Rab (mutaciones o cambios en su nivel de expresión) conllevan el desarrollo de diferentes patologías, desde enfermedades neurológicas hasta diabetes o cáncer (revisado por Li y Marlin, 2015). Concretamente, las mutaciones en Rab7, Rab23, Rab27, Rab38, y Rab39b provocan enfermedades genéticas (Charcot–Marie–Tooth tipo 2B, síndrome de Carpenter, síndrome de Griscelli, síndrome de Hermansky–Pudlak y retraso mental asociado al cromosoma X, respectivamente) (Li y Marlin, 2015). Por su parte, se han asociado niveles alterados en la expresión de Rab25 en cáncer de mama, ovario y colon, y de Rab31 en cáncer de mama, cerebro, piel, pulmón, colon y leucemia, mientras que Rab5 y Rab7 están sobreexpresados en el hipocampo de pacientes con enfermedad de Alzheimer y la desregulación del tráfico de GLUT4 mediada por Rab10 y Rab14 se ha asociado a diabetes de tipo II (Li y Marlin, 2015). Finalmente, estudios de nuestro laboratorio han mostrado que en

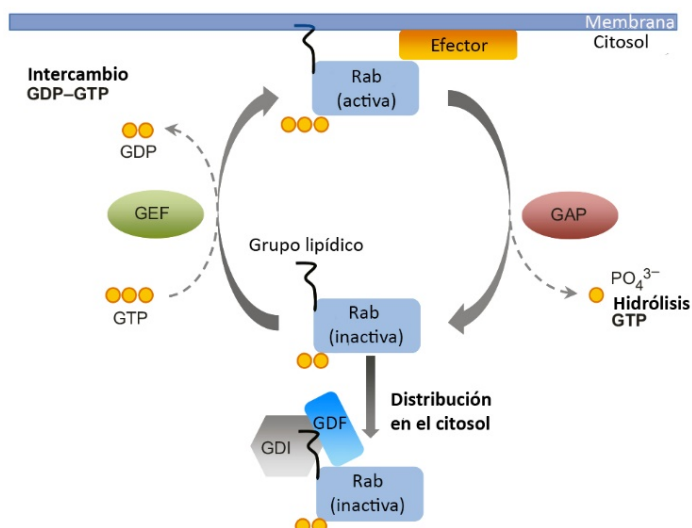


obesidad, tanto en humanos como en modelos animales de obesidad (genética – monogénica o poligénica- o inducida por dieta), se produce una sobreexpresión de Rab18 en el tejido adiposo (Pulido et al, 2011 y 2013).

Las GTPasas Rab controlan la biogénesis de vesículas mediante la formación de complejos reguladores (multisubunit Rab tethers) que interaccionan con las proteínas de la cubierta de las vesículas, de tipo COPI, COPII o de clatrina (Angers y Merz, 2011). Esto facilita su reclutamiento hacia las zonas de evaginación en el compartimento donador, definiendo con ello la identidad de la vesícula de nueva formación. Además, las proteínas Rab intervienen en el correcto transporte de las vesículas de transporte hacia el compartimento aceptor ya que interaccionan con los motores moleculares asociados a los elementos del citoesqueleto, facilitando el acercamiento de dichos motores a la membrana de las vesículas y modulando su movimiento a lo largo de la red del citoesqueleto (Hammer y Wu, 2002; Jordens et al., 2001; Stenmark, 2009; Miserey-Lenkei et al., 2010; Bhui y Roy, 2014; Delevoeye y Goud, 2015). Finalmente, las GTPasas Rab participan en el amarre, anclaje, docking y fusión de las membranas de las vesículas y del compartimento receptor ya que se asocian con proteínas v-SNARE y/o t-SNARE formando complejos trans-SNARE y organizando microdominios para la fusión de las membranas (Fig. 11) (Wickner y Schekman, 2008; Miserey-Lenkei et al., 2010; Bhui y Roy, 2014; Li y Marlin, 2015).

Las proteínas Rab están presentes en las membranas de todos los compartimentos intracelulares (RE, aparato de Golgi, endosomas, lisosomas, peroxisomas, GLs, mitocondrias), así como en la membrana plasmática y el núcleo (Stenmark, 2009). No obstante, cada Rab se localiza en orgánulos y/o dominios de membrana concretos, donde regula una ruta de tráfico de membrana específico (Stenmark, 2009; Pfeffer y Aivazian, 2004; Li y Marlin, 2015) (Fig. 14). La unión específica de las proteínas Rab a sus membranas diana concretas depende, al menos en parte, del dominio con mayor divergencia evolutiva entre las proteínas Rab o “dominio hipervariable”, que se encuentra en la región carboxilo-terminal de estas proteínas (Stenmark *et al.*, 1994; Ali *et al.*, 2004). Así, es en el dominio hipervariable de las proteínas Rab donde se unen uno o dos grupos isoprenoides geranylgeranilo (20 carbonos) que permiten su anclaje a las membranas diana (Leung *et al.*, 2007).





**Figura 15.** Ciclo de activación de las Rab GTPasas. Las proteínas Rab ciclan entre un estado inactivo y distribuidas en el citosol cuando están unidas a GDP, y un estado activo si están ligadas a GTP, asociándose a su membrana diana. En este proceso participan diferentes proteínas reguladoras entre las que se encuentran intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEF), proteínas inhibitoras de disociación de GDP (GDI), *GDI displacement factors* (GDF), y proteínas activadoras de GTPasas (GAP). Modificado de Bento *et al.*, 2013.

El intercambio de GDP por GTP produce un cambio en la estructura terciaria de la proteína, lo que a su vez define su especificidad (Pfeffer, 2013). Este proceso está facilitado por las proteínas denominadas factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GDP/GTP exchange factors, GEFs), los cuales debilitan la interacción de GDP y facilitan la unión de GTP (Barr y Lambright, 2010; Chaîneau, et al., 2013). Por otra parte, a pesar de ser GTPasas, tienen una capacidad reducida de hidrolizar GTP y por tanto, de inactivarse de forma espontánea, por lo que son asistidas en este proceso por proteínas activadoras de GTPasas (i.e. GTPase-activating proteins, GAPs). Por otro lado, la actividad de estas GTPasas está modulada por las denominadas Rab GDP dissociation inhibitor (i.e. RabGDI), que evitan la liberación de GDP y estabilizan a la Rab en su forma inactiva, y por los GDI displacement factors (i.e. GDF), que reconocen a complejos Rab-RabGDI específicos y promueven la liberación de GDI y la unión de GEF a la proteína Rab. Se ha propuesto que una misma GDF podría interactuar con varias proteínas Rab (Pfeffer y Aivazian, 2004). Por su parte, hasta el momento sólo se han descrito dos proteínas GDI, GDI1 y GDI2, que presentan expresión en el tejido nervioso y ubicada, respectivamente (Alory y Balch, 2001). Por otra parte, se propone que existe una proteína GAP para

cada proteína Rab, aunque todas las GAPs identificadas hasta el momento, excepto Rab3GAP, tienen un dominio común, el dominio TBC (Tre-2/Bub2/Cdc16)/Rab-GAP (Barr y Lambright, 2010; Fukuda, 2011; Chaineau et al., 2013). Por su parte, las GEFs de proteínas Rab forman una familia no relacionada estructuralmente, entre la que se incluyen proteínas que presentan dominios DENN (differentially expressed in normal and neoplastic cells), VPS9 (vacuolar protein sorting 9) o Sec2, complejos TRAPP (transport protein particle), heterodímeros GEFs (Mon1-Ccz1, HPS1-HPS4 (complejo BLOC-3), Ric1-Rgp1 y Rab3GAP1/2), y otras GEFs (i.e., REI-1 y RPGR) (Ishida et al., 2016).

Una vez en su membrana diana, la Rab activa se une a efectores que aumentan su estabilidad y traducen su acción sobre la membrana/vesícula diana (Aivazian et al., 2006; Grosshans et al., 2006; Zhen y Stenmark, 2015; Li y Marlin, 2015). Interesantemente, cada proteína Rab recluta un conjunto de proteínas efectoras en la superficie de las membranas y de esta manera ensamblan en éstas la maquinaria molecular apropiada para mediar la interacción o fusión de membranas o la unión a proteínas motoras específicas. Una vez que la proteína Rab activa se une a sus efectores, estos ayudan directamente a su localización, evitando su difusión en la membrana o bloqueando de forma indirecta la inactivación de la GTPasa. Las moléculas efectoras de las proteínas Rab son muy variadas, e incluyen adaptadores, factores de amarre, quinasas, fosfatasas y proteínas motoras (Stenmark, 2009). Por otra parte, un mismo efector puede unirse a más de una proteína Rab, como es el caso de la proteína GCC185, localizada en las membranas del aparato de Golgi, y que interacciona con Rab1, Rab2, Rab6, Rab9, Rab15, Rab27B, Rab30 y Rab33B (Burguette et al., 2008; Hayes et al., 2009; Barr, 2009). Estudios realizados en células vivas han permitido mostrar que Rab4, Rab5 y Rab11 están presentes en dominios distintos en el compartimento endosomal (Sönnichsen et al., 2000), y que Rab7 y Rab9 definen microdominios diferentes en endosomas tardíos (Barbero et al., 2002). De esta manera, actualmente se acepta que los compartimentos celulares consistirían en mosaicos de proteínas Rab concretas, reclutadas a partir de proteínas efectoras específicas, que actuarían de forma cooperativa para generar entornos particulares y definidos en las membranas celulares (Barr, 2013). De la misma manera, cada proteína Rab puede asociarse a varios efectores, modulando distintos procesos

asociados al transporte de membranas, como es el caso de Rab1, que se localiza en zonas de salida del RE y en el ERGIC y también media el tráfico vesicular entre el Golgi y el RE (Stenmark, 2009).

Las proteínas Rab juegan papeles cruciales en las rutas de endocitosis y exocitosis, controlando el tráfico anterógrado y retrógrado entre compartimentos para gestionar la entrega de cargo y el reciclaje de membrana (Schwartz *et al.*, 2008; Vonderheit y Helenius, 2005; Li y Marlin, 2015; Zhen y Stenmark, 2015). Por ejemplo, al igual que Rab1, Rab2 se encuentra en el ERGIC, donde se ha sugerido que participan en el control bidireccional del tráfico entre el Golgi y el RE (Galea *et al.*, 2015; Zhen y Stenmark, 2015). Por su parte, en el aparato de Golgi se ha descrito la presencia de hasta 20 de las 70 proteínas Rab existentes (66 en el genoma humano), en donde se ha propuesto que ayudan a especificar la identidad de las cisternas y a mantener su estructura (incluyendo el mantenimiento del *Golgi ribbon*, o conjunto de dictiosomas de una célula), y regulan además los procesos de tráfico (Liu y Storrie, 2015; Pfeffer, 2013; Liu y Storrie, 2015; Kim *et al.*, 2016). En particular, Rab1, Rab6, Rab30 y Rab41 organizan el *Golgi ribbon* y Rab6, Rab33, Rab34, Rab40, Rab41 y Rab43 median el tráfico intra-Golgi (Galea *et al.*, 2015; Liu y Storrie, 2015; Zhen y Stenmark, 2015). Rab8 participa en la ruta de secreción constitutiva entre la red *trans* del Golgi y la membrana plasmática, y también regula la translocación de GLUT4 a la superficie (junto con Rab10 y Rab14) y la formación de cilios (como Rab17 y Rab23), mientras que Rab27 media la translocación de melanosomas a la superficie celular. El tráfico vesicular entre TGN y endosomas tempranos está mediado por Rab22, mientras que Rab9 regula el transporte de endosomas tardíos hacia el TGN. Rab15 está involucrada en el tráfico entre endosomas tempranos y endosomas de reciclaje y en el tráfico de endosomas de reciclaje desde la membrana apical a las membranas basolaterales. La maduración de endosomas tardíos y fagosomas y su fusión con lisosomas está mediada por Rab7. Rab3, Rab26, Rab27 y Rab37 también participan en varias fases de la ruta de secreción regulada. Por su parte, Rab5 está localizada en endosomas tempranos, fagosomas, caveosomas, y la membrana plasmática, y participa en la endocitosis. Además, Rab5 interviene en la maduración de endosomas tempranos con Rab14 y Rab22, y, junto con Rab34, en macropinocitosis. Otras Rabs que intervienen en macropinocitosis son Rab7, Rab20 y Rab21 (Swanson 2008; Egami *et*

*al.*, 2016). Otros ejemplos incluyen Rab33 que, junto con Rab24, regula la formación de autofagosomas, o Rab32, que controla la fisión mitocondrial y junto a Rab38, también interviene en la biogénesis de melanosomas. Finalmente, Rab4 controla las fases rápidas de la endocitosis de reciclaje, mientras que Rab11 y Rab35 regulan las fases lentas (Stenmark, 2009; Zhen y Stenmark, 2015) (Fig. 15).

Respecto a las proteínas Rab y GLs, estudios de proteómica de GLs tanto de adipocitos como de otras células que pueden acumular lípidos en respuesta a ácidos grasos, concretamente células HepG2 o CHO, han demostrado la presencia en éstas de numerosas proteínas Rab (Brasaemle *et al.*, 2004; Ding *et al.*, 2012; Beilstein *et al.*, 2013; Rabanal, 2013). Entre ellas, la mejor caracterizada en relación a la función de las GLs es Rab18, cuya expresión en adipocitos y en células HepG2 fue descrita en 2005 (Martin *et al.*, 2005; Ozeki *et al.*, 2005). Estos trabajos iniciales, junto con estudios de nuestro laboratorio han permitido demostrar que Rab18 interviene en la lipólisis mediada por receptores  $\beta$ -adrenérgicos así como en la lipogénesis inducida por insulina y, de hecho, se asocia a las GLs tanto en respuesta a isoproterenol como a insulina (Martin *et al.*, 2005; Ozeki *et al.*, 2005; Pulido *et al.*, 2011; Rabanal, 2013). Más aún, nuestros estudios de microscopía y videomicroscopía también apoyan la idea de que Rab18 puede participar en la interacción entre GLs y el RE, además de, como se mencionó anteriormente, en la asociación de GLs con mitocondrias y peroxisomas, participando así en la regulación del metabolismo tanto de lípidos neutros como de fosfolípidos (Rabanal, 2013 y datos no publicados). Otras proteínas Rab que han sido estudiadas en adipocitos incluyen Rab5, que se ha demostrado que participa en la internalización de GLUT4 inducida por insulina gracias al reclutamiento de dineína, facilitando la interacción entre vesículas con GLUT4 y la red de microtúbulos (Huang *et al.*, 2001), o Rab35, que facilita el acercamiento de GLs a los endosomas gracias al reclutamiento del factor de *tethering* EEA1, para permitir la transferencia de lípidos entre ambos compartimentos. (Liu *et al.*, 2007).

Recientemente, nuestro laboratorio ha identificado a la GTPasa Rab34 en estudios de proteómica de GLs aisladas de adipocitos 3T3-L1 diferenciados, tanto en condiciones como en respuesta al tratamiento con insulina (Rabanal, 2013). Sin embargo, se desconoce aún la localización precisa, regulación y función de esta

GTPasa en adipocitos u otros tipos celulares que acumulan GLs, especialmente en condiciones patológicas.

### 1.10.1. Rab34

Rab34 fue caracterizada por primera vez en 2002 (Wang y Hong, 2002). Se trata de una proteína de 259 aminoácidos, con un peso molecular de 29 kDa, con una alta conservación de secuencia entre especies (Wang y Hong, 2002; Chen *et al.*, 2003), incluyéndose junto con Rab36 en el mismo subgrupo de proteínas Rab por su homología parcial de secuencia (Fukuda, 2008).

Los estudios iniciales sobre Rab34 mostraron que esta GTPasa se localizaba parcialmente en el citosol pero, fundamentalmente, en el aparato de Golgi en células NRK y le asignaron una función en relación con el posicionamiento de los lisosomas en la región peri-nuclear, en un proceso dependiente de su interacción con la proteína RILP (*Rab-interacting lysosomal protein*) (Wang y Hong, 2002). Estudios recientes han mostrado que Rab34 unido a las membranas perinucleares retiene y reduce la movilidad de los lisosomas mediante la interacción de RILP con la proteína asociada a lisosomas, foliculina (Starling *et al.*, 2016). Por otra parte, se ha demostrado que Rab34 media la fusión entre fagosomas y lisosomas/endosomas, facilitando la biogénesis de los fagolisosomas y el transporte de cargo lisosomal hasta éstos en macrófagos y células dendríticas (Kasmapour *et al.*, 2012; Alloati *et al.*, 2015). Más aún, se ha observado que la activación temprana del factor NF- $\kappa$ B durante la infección de macrófagos por bacterias induce la expresión de Rab34 en estas células (Gutierrez *et al.*, 2008; Kasmapour *et al.*, 2012). En este sentido, también se ha demostrado que Rab34 regula la transferencia de la proteasa lisosomal catepsina D a los fagosomas en macrófagos tras la infección con bacterias (Seto *et al.*, 2011). Se ha propuesto que la acción de Rab34 sobre la maduración de los lisosomas depende de su interacción con Munc13-2 (Kasmapour *et al.*, 2012), que constituye, junto a RILP, otro de los efectores identificados para Rab34 (Speight y Silverman, 2005). Curiosamente, Rab34 interacciona con Munc13-2 en las membranas del Golgi, donde se ha propuesto que median el transporte de cargo vía ruta de secreción constitutiva,

especialmente en condiciones de hiperglucemia (Goldenberg *et al.*, 2007; Goldenberg y Silverman, 2009).

Adicionalmente, estudios en células COS-1 han revelado que Rab34 colocaliza con actina en los lamelipodios (i.e., prolongaciones de la membrana plasmática formados por el citoesqueleto de actina), donde actuaría facilitando la formación de macropinosomas (Sun *et al.*, 2003). A su vez, Rab34 también ha sido descrita como controlador y marcador de la micropinocitosis, que es un tipo de endocitosis independiente de clatrina (Bhuin y Roy, 2014; Zhang *et al.*, 2016). En relación a esta ruta, se ha visto que una de las vías principales a través de las cuales se internalizan las nanopartículas es la ruta de micropinocitomas (Rab34)/endodomas tardíos (Rab7)/lisosoma (Zhang *et al.*, 2016).

Finalmente, se ha propuesto que Rab34 podría constituir un posible factor tumorigénico en cáncer de próstata, dado que su expresión (y la de foliculina) disminuye tras tratamiento anti-tumoral (Aakula *et al.*, 2016). En esta línea, pacientes con un pronóstico significativamente peor en glioma muestran niveles elevados de expresión de Rab34 por lo que se ha propuesto que podría servir como biomarcador de la progresión y prognosis en este tipo de tumores (Wang *et al.*, 2015).

En resumen, la proteína GTPasa Rab34 ha sido descrita en varios tipos celulares, cumpliendo diversas funciones, destacando las relacionadas con la endocitosis y fagocitosis, pero su función en el tejido adiposo, y en especial en las GLs, todavía no ha sido analizada.





# OBJETIVOS



El objetivo general de la presente Tesis Doctoral ha sido la caracterización de nuevos marcadores moleculares reguladores del funcionamiento de los adipocitos, de su dinámica y como ésta se ve afectada en procesos patológicos. Para ello, se han elegido las proteínas NECC2 y Rab34 como moléculas modelo para analizar su función en relación a la respuesta a insulina y al tráfico y/o gestión intracelular de lípidos, respectivamente. Para lograr este objetivo general nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Análisis de la expresión y distribución de las proteínas NECC2 y Rab34 en adipocitos durante el proceso de diferenciación celular y/o en condiciones de acumulación de lípidos en éste u otros tipos celulares (hepatocitos).
2. Determinar la relevancia de estas proteínas en relación a procesos clave en la citofisiología de los adipocitos: respuesta a insulina y acumulación de lípidos.
3. Caracterización de la regulación de la expresión de NECC2 y Rab34 en condiciones fisiológicas y patológicas, utilizando tanto modelos *in vitro* de hipertrofia y/o resistencia a insulina como muestras de tejido adiposo de individuos delgados y de obesos con distintos grados de sensibilidad a insulina.



# MATERIALES Y MÉTODOS



### 3.1. Material Biológico

#### 3.1.1. Cultivo de líneas celulares

En el presente estudio se utilizaron dos líneas celulares: la línea celular de fibroblastos proveniente de embriones de ratón 3T3-L1 y la línea celular de hepatoma humano HepG2.

Las células 3T3-L1 se obtuvieron de la ATCC (American Type Culture Collection; LGC Standards S.L.U., Barcelona) y fueron cultivadas según las indicaciones del comerciante, tomando en consideración que las células no llegaran a una confluencia superior al 70-80% durante la fase de mantenimiento. Todos los experimentos se llevaron a cabo usando células de los pases 4 a 15. A partir del 15<sup>º</sup> pase, las células se desecharon para ser sustituidas por nuevas células mantenidas en N<sub>2</sub> líquido. El cultivo de las células 3T3-L1 se realizó en medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* [DMEM, Lonza (Vervies, Bélgica)] con 4,5 g/l de glucosa, suplementado con L-glutamina 4 mM, antibiótico-antimicótico al 1% (v/v), 1,5 g/l de bicarbonato sódico y suero de neonato bovino (NCS) al 10% (v/v) [Gibco (Barcelona)] y se mantuvieron a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Los cultivos de mantenimiento se realizaron en botellas de 75 ó 150 cm<sup>2</sup> a una densidad de 1.800 células/cm<sup>2</sup>, que se subcultivaron 2 veces por semana mediante el uso de una solución comercial de 0,5 g/l de tripsina y 0,2 g/l de EDTA (Sigma-Aldrich, Química S.A., Madrid). Las células obtenidas se sometieron a un test de viabilidad celular con azul tripán y posteriormente se sembraron en el soporte adecuado a los requerimientos de cada experimento. Concretamente, para los estudios de microscopía las células fueron sembradas sobre cubreobjetos de 25 mm de diámetro, que se ubicaron en placas de 35 mm de diámetro. Las células utilizadas para la obtención de extractos proteicos o de ARN se sembraron directamente en placas de 35 mm de diámetro. Por otro lado, las células destinadas a experimentos de electroporación fueron sembradas en placas de 150 mm de diámetro. En todos los casos, la densidad celular de siembra fue de 3.000 células/cm<sup>2</sup>. Para llevar a cabo la diferenciación celular a adipocitos, las células se mantuvieron en crecimiento hasta llegar al 100% de confluencia, momento en el cual se cultivaron en DMEM con 4,5 g/l de glucosa



suplementado con L-glutamina (4 mM), solución antibiótica-antimicótica al 1% (v/v), bicarbonato (1,5 g/l), suero fetal bovino (FBS) al 10% (v/v) (PAA, Pasching, Austria), 10 µg/ml de insulina, 0,25 µM de dexametasona y 0,5 mM de IBMX (*Medio de diferenciación I*) durante 72 h. Transcurrido este tiempo, las células se incubaron en DMEM con glucosa (4,5 g/l) suplementado con L-glutamina (4 mM), solución antibiótica-antimicótica al 1% (v/v), bicarbonato sódico (1,5 g/l), suero fetal bovino (10% v/v) e insulina (10 µg/ml) (*Medio de diferenciación II*), durante 72 h. A partir de ese momento, los cultivos celulares se mantuvieron en DMEM con 4,5 g/l de glucosa suplementado con L-glutamina (4 mM), solución antibiótica-antimicótica (1% v/v), bicarbonato sódico (1,5 g/l), FBS (10% v/v) (*Medio de diferenciación III*). El medio se renovó cada 48 h, hasta que las células fueron utilizadas para las distintas manipulaciones experimentales (día 2 para experimentos de transfección; día 6 para los experimentos de electroporación; días 0-3-6-8-10 para los estudios de adipogénesis; días 8-10 para los estudios de adipobiología funcional).

Por otro lado, la línea celular HepG2 fue amablemente proporcionada por el Dr. Manuel de la Mata (IMIBIC, Córdoba, España). Los cultivos celulares se mantuvieron en un incubador a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Estas células fueron utilizadas entre los pases 2 y 20. La línea fue cultivada en medio MEM (Gibco) conteniendo glucosa 1 g/l y L-glutamina 2 mM, y suplementado con solución antibiótica-antimicótica al 1% (v/v) (Gibco), aminoácidos no esenciales al 1% y FBS al 10% (v/v). Los cultivos de mantenimiento se realizaron en botellas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> (TPP, Trasadingen, Suiza) y se subcultivaron dos veces por semana utilizando una solución comercial de tripsina 0,5 g/l y EDTA 0,2 g/l (Sigma-Aldrich). Las células así obtenidas se sembraron en placas de 3,5 mm ó 10 cm de diámetro (TPP) a una densidad de 2.000 células/cm<sup>2</sup>.

### 3.1.2. Obtención de muestras de tejido adiposo humano.

Se utilizaron muestras de tejido adiposo humano, visceral y subcutáneo, obtenidas de individuos delgados [Índice de masa corporal (IMC) ≤ 25 kg/m<sup>2</sup>] y de individuos obesos (IMC ≥ 30 kg/m<sup>2</sup>) sometidos a procedimientos quirúrgicos laparoscópicos (funduplicatura de Nissen para reparación de hernia de hiato o

colecistectomía) o bypass gástrico. Para este estudio se utilizaron dos cohortes, en las cuales los individuos obesos se clasificaron de acuerdo a parámetros de sensibilidad a insulina siguiendo los criterios del *Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes* de la Sociedad Americana de Diabetes (Wolins NE, et al., 2006). Los análisis bioquímicos y hormonales se llevaron a cabo siguiendo procedimientos descritos previamente (Kanzaki M., 2006; Rodriguez A et al., 2010; Guzmán-Ruiz et al., 2014). La primera cohorte, se clasificó a los pacientes en tres grupos: normoglucémicos (NG), con intolerancia a glucosa o pre diabéticos (IGT) o con diabetes de tipo 2 (T2D). Es importante mencionar que los individuos obesos con T2D no estaban bajo tratamiento con insulina u otra medicación que pudiera alterar los niveles endógenos de esta hormona. Esta cohorte se utilizó para el análisis de la expresión de ARNm. Los parámetros antropométricos de los pacientes de la cohorte analizada por qRT-PCR se detallan en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Características bioquímicas y antropométricas de sujetos utilizados para estudios de qRT-PCR

Variables	Obesos				P
	LN	NG	IGT	T2D	
n	4	11	11	12	
Sexo, H/M	2/2	5/6	5/6	6/6	
Edad, años	41,0±2,7	41,3±3,7	42,4±1,9	48,7±2,5	0,185
Peso, kg	66,4±7,5	112,5±6,4*	131,4±6,5*	125,2±7,6*	<0,001
IMC, kg/m <sup>2</sup>	22,2±0,9	41,2±2,0*	47,8±2,0*	44,8±2,5*	<0,001
Grasa corporal, %	28,4±2,6	45,9±3,3*	53,3±1,7*	47,8±2,4*	<0,001
Circunferencia de cintura, cm	73,0±4,0	115,6±3,3*	116,6±4,5*	122,4±4,1*	<0,001
Glucosa, mg/dl	89,2±3,3	92,0±2,1	105,4±3,7* <sup>†</sup>	145,6±7,8* <sup>†,‡</sup>	<0,001
Insulina, µU/ml	6,1±0,5	15,0±2,5*	11,1±1,4*	29,0±6,0*	0,003
HOMA	1,4±0,2	3,4±0,6*	3,0±0,4*	11,0±2,5* <sup>‡</sup>	0,001
Triglicéridos, mg/dl	74,7±10,9	116,6±7,7	125,7±42,8	137,7±14,5	0,661
Colesterol total, mg/dl	192,7±13,4	196,3±13,4	197,4±12,9	207,5±14,5	0,905
LDL-C, mg/dl	121,5±12,3	128,0±13,1	119,7±10,9	135,4±11,5	0,756
HDL-C, mg/dl	56,2±1,6	39,2±4,2	52,7±7,5	40,1±2,9	0,134
Ácido úrico, mg/dl	4,5±0,4	6,6±0,7	6,7±0,5	6,6±0,4	0,104
Fibrinógeno, mg/dl	247,5±119,5	343,3±17,0	349,1±28,6	341,0±43,3	0,682
Homocisteína, µmol/l	7,9±1,6	7,8±0,8	7,5±0,8	7,7±0,8	0,991
vWF, %	92,0±18,0	136,5±15,9	156,7±30,2	161,5±17,1	0,591
Leptina ng/ml	8,8±1,3	42,6±8,9*	59,5±8,5*	40,6±11,0	0,013

Los datos están representados como la media ± SEM. Los individuos fueron clasificados por edad y sexo en toda la cohorte, y por grasa corporal en los grupos de obesos. LN, delgados; NG, normoglucémicos; IGT, intolerantes a la glucosa o pre diabéticos; T2D, con diabetes tipo 2.

IMC, índice de masa corporal; CRP, proteína C reactiva; HOMA, índice HOMA; LDL, lipoproteína de baja densidad; HDL, lipoproteínas de alta densidad; vWF, factor von Willebrand. Las diferencias entre grupos fueron analizadas por ANOVA seguido del test Tukey o Games-Howell's. \* $P < 0,05$  vs. LN, † $P < 0,05$  vs. OB-NG, ‡ $P < 0,05$  vs. OB-IGT. El HOMA fue transformado logarítmicamente para el análisis estadístico.

Por otro lado, para el estudio de expresión de proteína en tejido adiposo se utilizó una segunda cohorte, en la cual no se contó con el análisis de test de intolerancia a la glucosa para poder clasificar a los sujetos obesos entre IGT y T2D, por lo cual se los englobó en insulino resistentes. La información del perfil antropométrico de dichos sujetos se detalla en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Características bioquímicas y antropométricas de sujetos utilizados para estudios de expresión de proteína.

Variables	LN	Obesos		P (ANOVA)
		NG	Insulino resistentes	
n	8	7	6	
Sexo, H / M	3 / 5	3 / 4	3 / 3	
Edad, años	58,75 ± 6,37	42,29 ± 2,93*	39,33 ± 1,86 **	< 0,01
Peso, kg	61,00 ± 2,86	154,64 ± 9,52 ***	161,40 ± 8,93 ***	< 0,001
IMC, kg/m <sup>2</sup>	23,96 ± 0,53	54,17 ± 2,18 ***	55,05 ± 1,96 ***	< 0,001
Circunferencia de cintura, cm	83,00 ± 4,05	132,25 ± 5,36 ***	150,17 ± 7,36 ***	< 0,001
Glucosa, mg/dl	95,00 ± 3,46	93,00 ± 5,52	111,00 ± 8,74	0,099
Insulina, µU/ml	6,00 ± 1,75	14,05 ± 2,35	40,95 ± 0,55 ***, ††	< 0,001
HOMA	1,29 ± 0,24	3,49 ± 0,35	11,63 ± 1,53 ***, †††	< 0,001
Triglicéridos, mg/dl	117,86 ± 10,11	109,00 ± 23,92	139,80 ± 19,21	0,582
Colesterol total, mg/dl	222,13 ± 12,90	197,14 ± 10,24	187,67 ± 13,31	0,142
LDL-C, mg/dl	134,57 ± 8,10	140,37 ± 4,41	118,52 ± 11,93	0,355
HDL-C, mg/dl	53,14 ± 3,03	51,00 ± 7,37	43,40 ± 4,01	0,257
Ácido úrico, mg/dl	4,48 ± 0,48	6,63 ± 0,38	6,74 ± 0,95	< 0,05

Los datos están representados como la media ± SEM. Los individuos fueron clasificados por edad, y por grasa corporal en los grupos de obesos. LN, delgados; NG, normoglucémicos; H, hombres; M, mujeres; IMC, índice de masa corporal; HOMA, índice HOMA; LDL, lipoproteína de baja densidad; HDL, lipoproteínas de alta densidad. Las diferencias entre grupos fueron analizadas por ANOVA. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  vs. LN; †† $P < 0,01$ , ††† $P < 0,001$  vs. OB-NG. El HOMA fue transformado logarítmicamente para el análisis estadístico.

Las muestras se obtuvieron siguiendo la normativa recogida en la legislación nacional y europea y aprobada por el Comité Bioético del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba así como de la Clínica Universitaria de Navarra en el caso de las muestras utilizadas para estudios de qRT-PCR y del Hospital Virgen de la Victoria

de Málaga para el estudio de expresión proteica. En todos los casos se obtuvo el consentimiento informado del paciente.

Tras su obtención, las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-80$  °C para los análisis de expresión génica y proteica de tejido adiposo total o bien se procesaron para la separación de los componentes celulares de dicho tejido, como se describe a continuación.

### **3.1.2.1. Dispersión de tejido adiposo y obtención de adipocitos maduros y fracción de estroma vascular.**

Las muestras de tejido destinadas a dispersión celular [tejido adiposo omental (TAV) y/o subcutáneo (TASC)] se introdujeron en Krebs-Ringer Hepes Buffer (KRB) inmediatamente después de su extracción y a continuación se realizó la dispersión celular. Los tejidos destinados a la extracción de ácidos nucleicos o proteínas se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-80$  °C hasta su posterior procesamiento.

La separación celular del tejido adiposo se realizó siguiendo el protocolo descrito por Rodbell (1964) y adaptado en nuestro laboratorio (Díaz-Ruiz *et al.*, 2015). Concretamente, las muestras se sumergieron en 20 ml de tampón KRB pH 7,4 (NaCl 119 mM, KCl 4,7 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM, CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM, Hepes 20 mM, pH 7,4, Glucosa 2 mM, BSA 2%), se eliminaron los restos de vasos sanguíneos y el tejido fue troceado en pequeños fragmentos en una placa de Petri de cristal con KRB utilizando dos bisturís. Los fragmentos fueron recogidos en 25 ml de KRB utilizando una pipeta Pasteur, añadiéndose una solución de colagenasa 2 mg/ml (Sigma-Aldrich) y la mezcla se incubó durante 1 hora a 37 °C en baño María en agitación suave. La solución resultante fue filtrada con filtros tipo *cell strainer* de 100 µm de poro para eliminar el tejido no disperso y fue lavada con DMEM suplementado con glutamina 4 mM, 1% de mezcla de antibiótico-antimicótico, 1,5 g/l de bicarbonato y 10% *Fetal Calf Serum* (FCS) (medio DMEM completo) para detener la reacción enzimática. En este punto, se separaron los adipocitos maduros de la fracción de estroma vascular (*pellet*; FSV) mediante una centrifugación a 600

x g durante 10 min a 37 °C. Todo el proceso de dispersión y manipulación se llevó a cabo en condiciones de esterilidad y empleando material estéril.

Los adipocitos maduros se resuspendieron en medio de dispersión (DMEM-F12 suplementado con biotina 8 mM, ácido pantoténico 18 mM, ácido ascórbico 100 mM, 1% antibiótico/antimicótico y BSA 10 mg/ml) a pH 7,4 y fueron lavados 2 veces, esperando entre 5 y 10 minutos entre cada lavado para recuperar los adipocitos maduros por flotación. Posteriormente a los lavados, se preparó una mezcla de 35 µl de adipocitos y 35 µl de matrigel (BD Biosciences, Bedford, MA, EE.UU.) que fue colocada rápidamente sobre un cubreobjetos dentro de una placa de 35 mm, se esparció la mezcla cuidadosamente sobre la superficie y se dejó 30 minutos a 37 °C. Pasado este tiempo, se añadió 1 ml de medio de dispersión a la placa, que se incubó 1 h a 37 °C, tras lo cual se realizó un lavado con PBS 1X y, a continuación, se fijaron los adipocitos con para-formaldehído (PFA) 4% durante 8 minutos y se continuó el protocolo de inmunotinción (ver apartado 3.3.1.).

Por su parte, el *pellet* fue resuspendido en medio DMEM completo, filtrado con un *cell strainer* de 40 µm de poro y centrifugado durante 5 minutos a 400 x g. El nuevo *pellet* fue resuspendido en 500 µl del buffer de lisis de eritrocitos (*RBC Lysis Solution*, Purigene, MN, EEUU), incubado durante 3 min a temperatura ambiente y centrifugado a 400 x g durante 10 minutos. El *pellet* resultante fue dividido en alícuotas que se destinaron bien a cultivos celulares o se congelaron a -80 °C hasta su procesamiento. En el primer caso, las células de FSV fueron sembradas a razón de 20.000 células por placa de 35 mm y cultivadas en medio de mantenimiento [DMEMF-12 (Lonza, Vervies, Bélgica) suplementado con 10% NCS, biotina 16 µM, ácido pantoténico 18 µM, ácido ascórbico 100 µM y 1% de solución de antibiótico/antimicótico] durante 2 días hasta obtener un 60% de confluencia. En este punto (día 0 de diferenciación), el medio de cultivo se sustituyó por medio de diferenciación 1 [DMEMF-12, biotina 16 µM, ácido pantoténico 18 µM, ácido ascórbico 100 µM, 1% de solución de antibiótico/antimicótico y glucosa 17,5 mM (medio de diferenciación base) suplementado con 3% NCS, insulina humana 10 µg/ml, dexametasona 0,1 µM, IBMX 0,5 mM y rosiglitazona 1 µmol/l] durante 3 días. A continuación, se cambió el medio por medio de diferenciación 2 (medio de

diferenciación base suplementado con 3% NCS, insulina humana 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y dexametasona 0,1  $\mu\text{M}$ ), que fue sustituido cada 2 días hasta el final de la diferenciación.

## 3.2. Transfección y electroporación de cultivos celulares

### 3.2.1. Vectores de expresión y silenciamiento y siRNAs utilizados

En el presente estudio se utilizaron varios vectores de sobreexpresión y silenciamiento detallados en la Tabla 3. El vector pCMV-cMyc, utilizado como control fue adquirido en Clontech (Mountain View, CA, EE.UU.). Los vectores de sobreexpresión de NECC2 pCMV-cMyc- y pGFP- fueron construidos en nuestro laboratorio con anterioridad (Diaz-Ruiz et al, 2013). Como control de sobreexpresión de GFP se utilizó el vector comercial pHRGFP-N1 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.). Los vectores de sobreexpresión de Rab34, así como los mutantes constitutivamente activo (Q111L) e inactivo (T66N) fueron amablemente proporcionados por el Dr. Tuanlao Wang (Membrane Biology Laboratory, Institute of Molecular and Cell Biology, Singapur, Singapur). Las bacterias, conteniendo los vectores Arf1-GFP (#39554) y pcDNA3.1mycBioID (#35700) se obtuvieron de Addgene (Cambridge, MA, EE.UU.). El vector pcDNA3.1mycBioID fue utilizado para introducir la secuencia de Rab34 utilizando primers específicos (forward 5'-CGACTCGAGATGATGAACATTCTGGCGCCC-3' y reverse 5'-CGAGGATCCTCAGGGACAACATGTGGCC-3') entre los sitios de restricción XhoI y BamHI. En cuanto a los vectores pGFP-HSL y pGFP-ATGL fueron proporcionados por el Dr. Takashi Osumi (Graduate School of Life Science, University of Hyogo, Hyogo, Japón).

Para los experimentos de silenciamiento se emplearon dos estrategias. La primera consistió en la generación de un vector de expresión con la secuencia shRNA 5'-GGAGGAGATAAGATTAAA-3, específica para el silenciamiento de NECC2. En este caso se utilizó como control la transfección de un vector para silenciamiento conteniendo el shRNA 5'-GCATTGAAGGCGAGAATTATTCAAGAGATAATTCTCGCC TTCAATGC-3' que carece de un ARNm diana concreto en células eucariotas (Béglé *et*

*al.*, 2009). Ambos vectores de expresión contenían la secuencia codificante de a GFP que fue utilizada para control del índice de transfección.

Por otro lado, la segunda estrategia utilizada para silenciamiento de Rab34 fue el uso del siRNA comercial ON-TARGETplus SMART mouse Rab34 (GE Dharmacon, Lafayette, CO, EE.UU.) y como control se empleó un siRNA comercial (Sigma-Aldrich). En todos los casos, las células fueron co-transfectadas con siRNAs Rab34 o control en paralelo con el vector de expresión phr-GFP-N1, que sirvió para estimar el índice de transfección celular en cada experimento.

**Tabla 3.** Vectores plasmídicos de expresión utilizados

No	Proporciona
pCMV-cMyc	Clontech (Mountain View, CA, EE.UU.)
pCMV-cMyc-NECC2	Díaz-Ruiz <i>et al.</i> , 2013
pGFP-NECC2	Díaz-Ruiz <i>et al.</i> , 2013
phrGFP-N1	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EE.UU.)
pEGFP-Rab34-WT	Tuanlao Wang (Singapore, Singapore)
pEGFP-Rab34-Q111L	Tuanlao Wang
pEGFP-Rab34-T66N	Tuanlao Wang
Arf1-GFP	Addgene (Cambridge, MA, EE.UU.)
pcDNA3.1mycBioID-Rab34	Desarrollado en este estudio
pGFP-ATGL	Takashi Osumi (Hyogo, Japón)
pGFP-HSL	Takashi Osumi
Kate-Rab34-WT	En estudio
pEGFP-N2-RNAi	Nicolas Vitale (Estrasburgo, Francia)
shRNA-NECC2	Díaz-Ruiz <i>et al.</i> , 2013

### 3.2.2. Transfección transitoria de líneas celulares

Los vectores plasmídicos de expresión fueron introducidos en células HepG2 y 3T3-L1 en días tempranos de diferenciación mediante transfección con lipofectamina 2000 (Invitrogen, Barcelona, España) o el reactivo polietilenimina, *PEI* (Polysciences Inc., Warminster, PA, EE.UU.) siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Las células HepG2 fueron transfectadas 2 ó 3 días tras su siembra, cuando el cultivo alcanzó una confluencia aproximada del 80%, mientras que, en el caso de las 3T3-L1, la transfección fue llevada a cabo a los 8 días tras su siembra (correspondiente al día 3 de diferenciación). Independientemente del reactivo de transfección empleado, se utilizó 1 µg de los distintos vectores de expresión por

cada 10 cm<sup>2</sup> de superficie de cultivo celular.

### **3.2.3. Electroporación de células 3T3-L1**

La introducción de vectores de expresión en células 3T3-L1 a partir de día 6 de diferenciación se llevó a cabo mediante electroporación, ya que la transferencia génica por métodos químicos resulta poco eficaz una vez que las células han adquirido gotas lipídicas. Para las electroporaciones se utilizó el sistema Gene Pulse X-cell (BioRad, Hercules, CA, EE.UU.) y cubetas de 2 mm de grosor (BioRad). Cada electroporación se realizó en un volumen final de 100 µl de medio D-PBS (Dulbecco-PBS sin Mg<sup>2+</sup> ni Ca<sup>2+</sup>, GibcoBRL), conteniendo aproximadamente 3.000.000 de células junto con 10 µg del vector correspondiente. Para la electroporación se utilizaron los siguientes parámetros: voltaje de 0,11 Kv y 500 µF de capacitancia durante 5 s. Una vez que las células fueron expuestas a la electroporación fueron resuspendidas en 1 ml de medio completo y finalmente sembradas en las placas correspondientes. Pasadas 24 h de la electroporación, el medio de cultivo fue refrescado y se utilizaron las células a las 48 h. En aquellos cultivos destinados a experimentos de imagen celular, las células electroporadas se cultivaron sobre cubreobjetos previamente tratados con Colágeno Tipo I (BD Biosciences, Bedford, MA, EE.UU.) a una concentración de 0,77 mg/ml.

## **3.3. Localización intracelular de NECC2**

### **3.3.1. Estudios de localización intracelular por inmunocitoquímica.**

Se analizó la distribución intracelular de NECC2 en adipocitos 3T3-L1 en respuesta a la exposición a metil-β-ciclodextrina (BMCD) o latrunculina B para determinar el efecto de la desestabilización de las caveolas y del citoesqueleto de actina, respectivamente (Molero *et al.*, 2001; Eyster *et al.*, 2005). Previamente a los tratamientos, las células se mantuvieron en medio DMEM con 4,5 g/l de glucosa suplementado con L-glutamina 4 mM, antibiótico-antimicótico al 1% (v/v) y 1,5 g/l de bicarbonato sódico durante 2 h (pretratamiento). A continuación, las células se incubaron en medio fresco sin suero conteniendo BMCD (5 µg/ml) (Sigma-Aldrich)



durante 90 min o latrunculina B (10  $\mu$ M) (Calbiochem, Darmstadt, Alemania) durante 30 min. Como controles se utilizaron cultivos paralelos de células 3T3-L1 que se mantuvieron en medio de pretratamiento bajo las mismas condiciones experimentales que los cultivos expuestos a los tratamientos descritos. Tras los tratamientos, las células se lavaron y procesaron para su inmunotinción y observación mediante microscopía confocal (ver apartado 3.7.).

Para la detección de las proteínas por inmunofluorescencia, las células se fijaron en para-formaldehído al 4% (m/v) a temperatura ambiente en tampón PBS [PBS 0,01M, pH 7,4] durante 10 min. Posteriormente, se lavaron tres veces con tampón PBS y se incubaron con tampón de bloqueo [PBS conteniendo saponina al 0,3% (v/v) y BSA al 1% (m/v)] durante 1 h. A continuación, las células se incubaron con el anticuerpo primario diluido en tampón de anticuerpo [PBS conteniendo saponina al 0,3% (v/v) y BSA al 0,5% (m/v)] durante toda la noche a 4 °C. En la Tabla 4 se indican los diferentes anticuerpos primarios utilizados para los estudios de inmunocitoquímica. El exceso de anticuerpo primario no unido fue eliminado mediante tres lavados con tampón PBS y las células fueron incubadas con el anticuerpo secundario apropiado conjugado con el fluorocromo Alexa 405, 488 ó 594 (Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.) a temperatura ambiente durante 2 h. Finalmente, las células se lavaron tres veces con tampón PBS y el cubreobjetos conteniendo las células inmunoteñidas se montó sobre un portaobjetos utilizando medio de montaje de PBS: Glicerol (1:1), DAPI [Tris-HCl 0,1 M, glicerol al 70% (v/v), n-propilgalato al 2% (m/v), DAPI 1  $\mu$ g/ml (Sigma-Aldrich), pH 9] o Fluorescent Mounting Medium (Dako, Carpinteria, CA). Por su parte, para el marcaje de los filamentos de actina se utilizó faloidina (Sigma-Aldrich) a una concentración de 0,15  $\mu$ M durante 30 min sobre células una vez fijadas y luego se continuó con el protocolo de inmunocitoquímica.

Para la detección de las proteínas por inmunofluorescencia, las células se fijaron en para-formaldehído al 4% (m/v) a temperatura ambiente en tampón PBS [PBS 0,01M, pH 7,4] durante 10 min. Posteriormente, se lavaron tres veces con tampón PBS y se incubaron con tampón de bloqueo [PBS conteniendo saponina al 0,3% (v/v) y BSA al 1% (m/v)] durante 1 h. A continuación, las células se incubaron

con el anticuerpo primario diluido en tampón de anticuerpo [PBS conteniendo saponina al 0,3% (v/v) y BSA al 0,5% (m/v)] durante toda la noche a 4 °C. En la Tabla 4 se indican los diferentes anticuerpos primarios utilizados para los estudios de inmunocitoquímica. El exceso de anticuerpo primario no unido fue eliminado mediante tres lavados con tampón PBS y las células fueron incubadas con el anticuerpo secundario apropiado conjugado con el fluorocromo Alexa 405, 488 ó 594 (Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.) a temperatura ambiente durante 2 h. Finalmente, las células se lavaron tres veces con tampón PBS y el cubreobjetos conteniendo las células inmunoteñidas se montó sobre un portaobjetos utilizando medio de montaje de PBS: Glicerol (1:1), DAPI [Tris-HCl 0,1 M, glicerol al 70% (v/v), n-propilgalato al 2% (m/v), DAPI 1 µg/ml (Sigma-Aldrich), pH 9] o Fluorescent Mounting Medium (Dako, Carpinteria, CA). Por su parte, para el marcaje de los filamentos de actina se utilizó faloidina (Sigma-Aldrich) a una concentración de 0,15 µM durante 30 min sobre células una vez fijadas y luego se continuó con el protocolo de inmunocitoquímica.

### **3.3.2. Estudios de la distribución de NECC2 mediante fraccionamiento subcelular**

#### **3.3.2.1. Fraccionamiento de caveolas**

Para el aislamiento de caveolas, se adaptó el método descrito por Peiró y colaboradores basado en la centrifugación de un extracto celular, obtenido en un tampón “libre de detergentes”, en un gradiente discontinuo de sacarosa (Peiro et al., 2000). Así, las células 3T3-L1 a día 6 de diferenciación crecidas a confluencia en placas de 15 cm de diámetro se recogieron por raspado de la placa en 0,5 ml de tampón de lisis (500 mM carbonato sódico, pH 11,0) conteniendo inhibidores de proteasas [PMSF 0,1 mM; quimostatina 5 µg/ml, leupeptina 5 µg/ml, antipaina 5 µg/ml, pepstatina A 5 µg/ml (CLAP)]. El extracto celular fue transferido a un tubo de plástico y se lisó haciéndolo pasar 20 veces a través de una aguja 25-G. Posteriormente, el homogenado se ajustó a una concentración de 45% de sacarosa mediante la adición de 0,5 ml de una solución de sacarosa al 90% preparada en tampón MBS [25 mM MES, pH 6,5, 0.15 M NaCl]. El homogenado se situó en el fondo de un tubo de

ultracentrífuga y sobre él se generó un gradiente discontinuo de sacarosa 5-35% mediante la adición de 2,4 ml de una solución de sacarosa al 35% y 0,6 ml de una solución de sacarosa al 5%, ambas preparadas en tampón MBS conteniendo 250 mM de carbonato sódico. El gradiente discontinuo obtenido (5-35-45 %) se centrifugó a 30.000 rpm durante 4 horas a 4 °C en un rotor SW60 (Beckman Coulter), y se recogieron nueve fracciones de 450 µl desde la parte superior del gradiente. En algunos experimentos, las proteínas de cada fracción fueron precipitadas mediante el método cloroformo/metanol (ver apartado 3.6.2.2.), y los precipitados fueron resuspendidos en 40 µl de tampón de carga 1,5x. La distribución de las distintas proteínas en las nueve fracciones (F1 a F9) obtenidas fue analizada mediante *Western Blotting*.

### **3.3.2.2. Aislamiento de fracciones citosólica y de membrana de los adipocitos**

El aislamiento de las fracciones citosólicas y de membrana de adipocitos 3T3-L1 se llevó a cabo lavando previamente las células con tampón de homogeneización HES (HEPES 20 mM, sacarosa 255 mM y EDTA 1 mM, pH 7,4). A continuación, las células fueron recogidas en un volumen final de 1 ml de tampón de homogeneización con inhibidores de proteasas [CLAP (1 µl/ml solución 0,1%) y PMSF (1 µl/ml solución 0,1%)] y homogenizadas con un homogenizador vidrio-vidrio durante 30 s. Posteriormente, el lisado fue pasado 20 veces a través de una aguja 25-G y centrifugado a 1.000 x *g* durante 10 min a 4 °C para eliminar los núcleos y las células no lisadas. Una alícuota del sobrenadante resultante (postnuclear supernatant, PNS) fue guardada para su posterior análisis. Por otro lado, el resto del sobrenadante fue centrifugado a 200.000 x *g* durante 2 h a 4 °C para obtener la fracción cruda de membrana (pellet) y la fracción citosólica (sobrenadante). El *pellet* fue resuspendido en 1 ml de tampón RIPA [Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tritón X-100 1% (v/v), deoxicolato sódico 1% (m/v), SDS 0,1% (m/v), pH 7,4] suplementado con inhibidores de proteasas [CLAP (1 µl/ml solución 0,1%) y PMSF (1 µl/ml solución 0,1%)] mediante pipeteo, pasando el extracto 5 veces a través de una aguja 25-G y sonicando. A continuación, se añadió la cantidad de volumen necesaria para igualar

el volumen de la fracción citosólica. Las fracciones obtenidas fueron precipitadas con acetona (ver apartado 3.6.2.2).

### 3.4. Localización intracelular de Rab34

#### 3.4.1. Estudios de localización intracelular por inmunocitoquímica

Para determinar la localización intracelular de Rab34 mediante inmunocitoquímica se empleó el mismo procedimiento empleado para NECC2 (ver apartado 3.3.1.) con la diferencia que para el análisis de Rab34 se utilizaron los anticuerpos primarios detallados en la Tabla 5.

La localización de Rab34 en las células 3T3-L1 también fue estudiada con el uso de la proteína exógena y su mutante activo Rab34 Q111L. Para ello se utilizaron células 3T3-L1 a día 6 de diferenciación en las cuales se sobreexpresaron dichas proteínas mediante electroporación (ver apartado 3.2.3.)

Adicionalmente, en aquellos casos en que únicamente se analizó la distribución de una proteína expresada exógenamente y unida a un marcador fluorescente (GFP), el protocolo de preparación de las muestras terminó tras la fijación, salvo que se estudiara su localización en combinación con alguna proteína endógena. En tales casos, la muestra se procesó a continuación para revelar la(s) proteína(s) endógenas utilizando el protocolo de inmunocitoquímica (ver apartado 3.3.1.) y los fluorocromos complementarios para realizar los dobles o triples marcajes.

**Tabla 5.** Anticuerpos primarios utilizados para los estudios de inmunocitoquímica de Rab34

Nombre	Origen	Dilución	Proporcionado por
Anti-Rab34	Conejo	1/500	Abcam
Anti-GM130	Ratón	1/500	BD Biosciences
Anti-Perilipina	Cobaya	1/1000	Progen
Anti-Sec23	Ratón	1/100	Santa Cruz
Anti-Ergic53	Ratón	1/100	Santa Cruz
Anti-Sintaxina6	Ratón	1/500	BD Biosciences
Anti-Arf1	Ratón	1/500	Abcam
Anti-HSL	Conejo	1/1000	Abcam
Anti-Golgin97	Ratón	1/500	Invitogen

### 3.5. Estudios funcionales

#### 3.5.1. Análisis del papel de NECC2 sobre la señalización mediada por insulina en adipocitos

Para analizar la respuesta intracelular activada por insulina en adipocitos 3T3-L1, se evaluaron los niveles de fosforilación de enzimas de la ruta de señalización asociada a insulina. Concretamente, en el presente estudio se analizaron los niveles de fosforilación de Akt y Erk en células en las que la expresión de NECC2 había sido modificada por sobreexpresión. Para ello, se utilizó el vector pGFP-NECC2 o su control, el vector vacío (*mock*). Las células electroporadas se distinguieron de otras células en el mismo cultivo por medio del uso del epítipo GFP como reportero de la electroporación. Así, los adipocitos 3T3-L1 fueron electroporados y sembrados en placas de 35 mm de diámetro. Los cultivos fueron sometidos a 2 h de pretratamiento con medio sin suero. Posteriormente, se añadió insulina 100 nM durante periodos cortos de tiempo (0, 5, 10, 15 y 20 min) y se recogieron los extractos proteicos en tampón SDS-DTT calentado previamente a 65 °C como se ha descrito previamente (ver apartado 3.3.1.). Como indicador de la respuesta celular activada por insulina, se analizaron los niveles de fosforilación de las proteínas Akt y Erk durante los tiempos de estimulación indicados. Para ello se llevó a cabo un *Western Blotting* utilizando los anticuerpos anti-fosfo-Akt (pAkt) (Ser473) y anti-fosfo-Erk (pErk) (Thr202/Tyr204). Del mismo modo, a partir de los mismos extractos, se analizó la cantidad total de Akt y Erk, respectivamente, utilizando anticuerpos anti-Akt y anti-Erk, normalizando así la carga de proteína en las diferentes calles. Finalmente, para obtener una cinética normalizada en la respuesta de Akt, los valores de densidad óptica (DO) obtenidos fueron referidos al valor de 5 min de estimulación con insulina de las células control (ya que no se observa fosforilación de Akt en ausencia del tratamiento).

Un ensayo similar fue realizado en condiciones de silenciamiento, en este caso las células fueron electroporadas con el siRNA R1, o el siRNA control (*mock*) y expuestas a insulina a periodos de 0, 5, 10, 20 y 40 min de insulina 100 nM.

### **3.5.2. Modelos celulares de obesidad para el análisis de la expresión de NECC2 y Rab34**

Por otra parte, se establecieron diversos modelos de adipocitos *in vitro* de hipertrofia celular y/o resistencia a insulina para determinar la regulación de NECC2, siguiendo la metodología puesta a punto en el laboratorio (Díaz-Ruiz *et al.*, 2015). Concretamente, a día 6 de diferenciación y tras 2 h de pretratamiento en medio libre de suero, los adipocitos 3T3-L1 se expusieron a oleato (500  $\mu\text{mol/l}$ ) (Sigma-Aldrich) o palmitato (500  $\mu\text{mol/l}$ ) (Sigma-Aldrich) en medio DMEM con BSA libre de ácidos grasos (Sigma-Aldrich) al 2% durante 18 horas para simular la sobrecarga de ácidos grasos a la que está sometida el tejido adiposo en obesidad, TNF- $\alpha$  (5 nmol/l) para simular *in vitro* el ambiente proinflamatorio existente en el tejido adiposo, o medio rico en glucosa (4,5 g/l) e insulina (100 nmol/l) (alta glucosa/alta insulina, HGHI) durante 24 h, para imitar las altas concentraciones circulantes de estos compuestos en condiciones de resistencia a insulina. En todos los experimentos se emplearon cultivos adicionales de células control, que se mantuvieron bajo las mismas condiciones experimentales que los cultivos expuestos a los tratamientos descritos. Al final de los tratamientos, las células se procesaron para estudios de *Western Blotting* (ver apartado 3.6.3.).

### **3.5.3. Estudios del efecto de la sobreexpresión de Rab34 sobre la organización estructural y funcional del aparato de Golgi**

Para evaluación el efecto de la sobreexpresión de Rab34 sobre el aparato de Golgi se utilizaron células 3T3-L1 a día 3 de diferenciación. Así, las cuales fueron transfectadas (ver apartado 3.2.) con el vector de expresión pEGFP-Rab34 o con el vector phrGFP-N1, utilizado como control. Pasadas 48 h las células fueron fijadas e inmunoteñidas con el anticuerpo anti-GM130 y analizadas por microscopia confocal. Una vez obtenidas las imágenes se cuantificó el número y área de las estructuras tubulo-vesiculares marcadas con GM130 en cada célula usando el software ImageJ 1,40V (NIH, EE.UU.) de la siguiente manera: se estableció un umbral binario (60-255 niveles de gris) que se aplicó a la proyección máxima de

planos en el eje Z de cada imagen, y se aplicó un filtro de tamaño superior a 5 pixels<sup>2</sup> para minimizar la elección de ruido de fondo, como estructuras del aparato de Golgi.

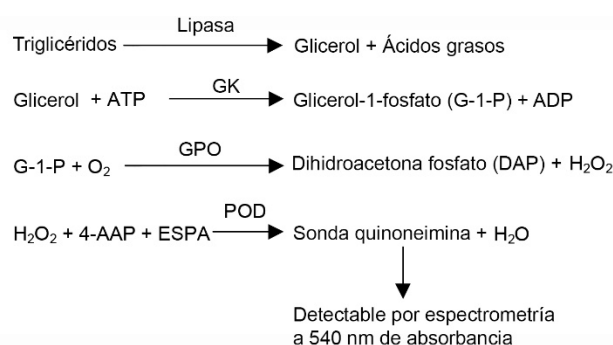
#### **3.5.4. Estudio de la acción de Rab34 en el proceso de adipogénesis**

Para analizar la relación de Rab34 con el proceso de adipogénesis y su posible asociación a gota lipídica se emplearon células 3T3-L1 a día 6 de diferenciación. Para emular el acúmulo de ácidos grasos en las células, éstas fueron cultivadas en placas de 35 mm de diámetro con cubreobjetos en su interior y expuestas durante 2 h a medio deprivado de suero y posteriormente incubadas con 1 ml de medio en presencia o ausencia de ácido oleico 250  $\mu$ M durante 18 h. A continuación, las células fueron lavadas 3 veces con 1 ml de PBS 1X con agitación durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las células fueron fijadas con PFA 4% durante 10 minutos. Una vez fijadas, las células se procesaron para inmunocitoquímica o tinción por Oil Red O (Sigma-Aldrich). En el primer caso las células fueron inmunoteñidas con anti-Rab34 en combinación con anti-PLIN y observadas al microscopio confocal. En el segundo caso, pasado el tiempo de fijación, el PFA fue retirado y se realizó un lavado rápido con 1 ml de isopropanol 60%. Tras la retirada del isopropanol, las células se secaron durante 15-30 min y se tiñeron con Oil Red O [6 partes de solución stock de Oil Red O (0,35 g Oil Red O en 100 ml de isopropanol) y 4 partes de agua destilada] durante 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, las células fueron lavadas 4-6 veces con agua destilada y montadas sobre un portaobjetos. Las células teñidas se observaron al microscopio confocal y se adquirieron, de forma aleatoria, 10 células por condición. Posteriormente las imágenes se deconvolucionaron y se las utilizó para hacer la medición del número medio de gotas lipídicas y del tamaño medio de las mismas utilizando el software ImageJ 1.40v. Para cuantificar el número y tamaño de las GLs se seleccionó el contorno de la célula para definir su área y delimitar las GLs en su interior, posteriormente se aplicó un umbral binario (60-200 niveles de gris) a la proyección máxima de planos en el eje Z de cada imagen, se hizo la conversión de  $\mu$ m<sup>2</sup> a pixels<sup>2</sup> utilizando como referencia el núcleo de la célula (10  $\mu$ m de diámetro), las GLs se definieron para estructuras superiores a 20 pixels<sup>2</sup>.

Adicionalmente, se analizó la relación de Rab34 en la adipogénesis en condiciones patológicas, para ello se empleó la línea celular HepG2, caracterizada por no tener GLs en condiciones basales. Así pues, se indujo la formación de gotas lipídicas en esta línea celular mediante un tratamiento con oleato (250  $\mu\text{mol/l}$ ) en ausencia de suero durante 18 h. Transcurrido este tiempo, las células se procesaron para su inmunotinción y posterior observación al microscopio confocal.

### 3.5.4.1. Determinación de la actividad lipogénica de células 3T3-L1

Las células expresando el vector de expresión pEGFP-Rab34 o phrGFP-N1 como control, se lavaron una vez con medio DMEM sin rojo fenol complementado con  $\text{NaHCO}_3$  20 mM, HEPES 1 mM, L-glutamina 4 mM y antibiótico-antimicótico al 1% (v/v), pH 7,4, para eliminar restos celulares y posteriormente se incubaron durante 2 h en medio de pretratamiento. A continuación, dicho medio fue sustituido por medio sin rojo fenol al que se añadió, o no, ácido oleico 250  $\mu\text{M}$  durante 18 h y suplementado, o no, con insulina 100 nM durante las últimas 4 h. Tras este tiempo, se recogieron las células en tampón RIPA para así determinar los triglicéridos intracelulares, tomándose además una pequeña alícuota de extracto celular para la determinación de proteína en cada extracto mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Para valorar la lipogénesis, se cuantificó la cantidad de triglicéridos intracelulares acumulados utilizando el método colorimétrico del kit comercial (Sigma-Aldrich). La Figura 16 muestra las reacciones llevadas a cabo con las enzimas y sustratos presentes en el kit.



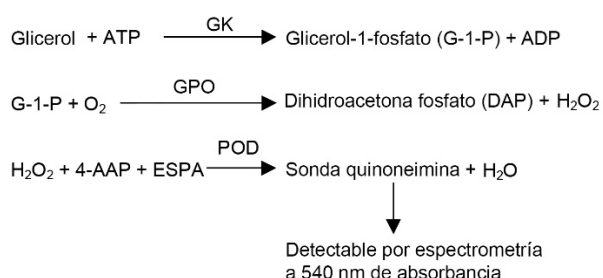
**Figura 16.** Reacciones que se llevan a cabo para la cuantificación de TAGs en las muestras.



Para este análisis, se utilizaron 50  $\mu\text{l}$  de extracto proteico [ó 10  $\mu\text{l}$  de Glycerol Standard (en dilución 1/10 y puro)] y 160  $\mu\text{l}$  de *Free Glycerol Reagent* y se midió la absorbancia a 540 nm transcurridos 15 min a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 40  $\mu\text{l}$  de *Triglyceride Reagent*, se esperó otros 15 min y se midió de nuevo la densidad óptica a 540 nm. Así, se obtuvo la cantidad de triglicéridos intracelulares, que fueron expresados en función a la cantidad de proteína de cada muestra (mg de triglicéridos/g de proteína).

### 3.5.4.2. Determinación de la actividad lipolítica de células 3T3-L1

De igual manera que en la medida lipogénica, las células sobreexpresando Rab34, se lavaron una vez con medio DMEM sin rojo fenol (Sigma-Aldrich) complementado con  $\text{NaHCO}_3$  20 mM, HEPES 1 mM, L-glutamina 4 mM y antibiótico-antimicótico al 1% (v/v), pH 7,4, para eliminar restos celulares, y posteriormente se incubaron durante 2 h en dicho medio (pretratamiento). A continuación, dicho medio fue sustituido por medio sin rojo fenol suplementado, o no, con isoproterenol (10  $\mu\text{M}$ ) y se incubaron durante 4 h. Tras este tiempo, se recogió el medio, se centrifugó a 6.000  $\times g$  durante 5 min para eliminar los restos celulares, y se llevó a cabo la cuantificación de glicerol libre utilizando el método colorimétrico del kit comercial *Free Glycerol Determination Kit* (Sigma-Aldrich). Este kit contiene las enzimas y sustratos necesarios para llevar a cabo las reacciones que se indican en la Figura 17.



**Figura 17.** Reacciones que se llevan a cabo para la cuantificación de glicerol libre en el medio.

El medio recogido se centrifugó a 6.000 x *g* durante 5 min para eliminar los restos celulares. Para la cuantificación del glicerol se utilizaron 50 µl de este medio (ó 10 µl de *Glicerol Standard* [en dilución 1/10 y puro]), a los que se añadieron 200 µl de *Free Glicerol Reagent*. Posteriormente, la mezcla se incubó durante 15 min a temperatura ambiente para posteriormente medir la DO a 540 nm. Por otra parte, también se recogieron las células de cada pocillo en tampón RIPA para la cuantificación de proteína mediante el método de Bradford.

### **3.5.5. Estudio del efecto de la sobreexpresión de Rab34 en el metabolismo lipídico en adipocitos**

Para ello células 3T3-L1 fueron transfectadas a día 3 de diferenciación con los vectores GFP vacío, utilizado como control, y GFP-Rab34. Pasadas 48 h de la transfección las células fueron expuestas a 2 h de pretratamiento con medio de cultivo sin suero, y posteriormente expuestas durante 4 h a isoproterenol 10 µM. Una vez finalizado el tratamiento las células fueron fijadas e inmunomarcadas con anti-HSL y observadas al microscopio confocal. En el caso de las células utilizadas para cuantificación de GLs y área de las mismas, se realizó un tratamiento con ácido oleico 250 µM durante 18 h, en presencia o ausencia de isoproterenol 10 µM durante las últimas 4 h de cultivo. Pasado este período, las células fueron fijadas y expuestas al anticuerpo anti-HSL y visualizadas por microscopía confocal. Para el análisis del número de GLs y área de las mismas se evaluó mediante *ImageJ* 1.40g como se describió anteriormente (ver apartado 3.5.4.). El grado de colocación entre HSL y GFP-Rab34 fue examinado por inspección visual de las imágenes confocales individualmente y se consideró colocación cuando las señales fluorescentes fueron coincidentes en los mismos planos. El coeficiente de colocación se evaluó posteriormente por el coeficiente de Manders usando el software Imaris 7.4.2. (Bitplane, Zurich, Suiza). El coeficiente de Manders varía entre 0 y 1, siendo 0 ausencia de colocación y 1 una superposición perfecta de ambas señales fluorescentes (Cruz-García *et al.*, 2012).

### 3.5.6. Identificación de proteínas interactoras de Rab34

Para aislar e identificar las posibles proteínas que interactúan con Rab34 se empleó la técnica denominada identificación de biotina dependiente de la proximidad, BioID (modificado de Roux *et al.*, 2012), para la cual las células fueron electroporadas con el vector pcDNA3.1mycBioID-Rab34. Transcurridas 24 h, las células se incubaron con medio fresco suplementado con 1 µg/ml de doxiciclina y 50 µM de biotina durante 24 h. A continuación, las células fueron lavadas 3 veces con PBS 1X y lisadas a 25 °C en 1 ml de buffer de lisis (50 mM Tris, pH 7,4, 500 mM NaCl, 0,4% SDS, 5mM EDTA, 1 mM DTT, y 1X de inhibidores de proteasas [Roche]) y posteriormente sometidas a 3 pulsos de sonicación de 10 s cada uno en presencia de Tritón X-100 (2%). Posteriormente se añadió un volumen igual de 50 mM Tris (pH 7,4) a 4 °C y se realizó una nueva serie de sonicación. Desde este punto, los pasos subsiguientes se realizaron a 4 °C. Las células fueron centrifugadas a 16.000 x g y el sobrenadante fue incubado con *Dynabeads* (en proporciones iguales mg proteína: mg de *Dynabeads*) (MyOne Streptavidin C1; Invitrogen, Barcelona) durante toda la noche. Al día siguiente las beads fueron recolectadas y lavadas dos veces durante 8 min a 25 °C en 1 ml de buffer 1 (2% SDS en H<sub>2</sub>O). A partir de este punto, los pasos subsiguientes se realizaron a 25 °C. Las beads a continuación fueron lavadas una vez con el buffer 2 (0,1% de deoxicolato sódico, 1% Tritón X-100, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, y 50 mM HEPES, pH 7,5) una vez con buffer 3 (250 mM LiCl, 0,5% NP-40, 0,5% deoxicolato sódico, 1 mM EDTA, y 10 mM Tris, pH 8,1) y dos veces con el buffer 4 (50 mM Tris, pH 7,4, y 50 mM NaCl). En este punto las *beads* fueron divididas para realizar estudios paralelos, el 10% (pequeña escala) se reservó para hacer un análisis por Western Blot y el 90% (gran escala) fue utilizado para espectrometría de masas.

Para el estudio a pequeña escala las proteínas fueron separadas de las *beads* magnéticas a 98 °C con 50 µl de Laemmli SDS buffer de muestra saturado con biotina. Posteriormente el extracto fue expuesto a un 1D SDS-PAGE y teñido con azul de Coomassie. Las bandas obtenidas fueron posteriormente analizadas mediante LC-MS/MS.

Para el estudio a gran escala las *beads* fueron previamente lavadas dos veces en 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , a continuación una suspensión de 100  $\mu\text{l}$  de *beads* fue expuesta a 20 mM DTT a 37 °C por 30 min para reducir las proteínas, transcurrido este tiempo se agregó yodoacetamida hasta una concentración final 20 mM y se incubó las *beads* a 37 °C durante 40 min en la oscuridad para la alquilación. Finalmente se agregó tripsina graduada para espectrometría de masas (Promega) a una relación 1:50 para digestión durante toda la noche a 37 °C. Al día siguiente las *beads* magnéticas fueron separadas mediante atracción magnética y se agregó ácido fórmico a la suspensión de péptidos hasta una concentración del 2%. A la solución resultante se le realizó un análisis de espectrometría de masas por un sistema nano-LC system Ekspert nLC415 (Eksigent, Dublin, CA) usando una columna C18 (75  $\mu\text{m}$  x 25 cm, 3  $\mu\text{m}$ , 100 Å) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) con un flujo constante de 300 nL/min. El espectrómetro de masas en un híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo Triple TOF 5600+ (Sciex, Redwood City, CA). Para hacer el análisis de los péptidos se utilizó el software Protein Pilot v 5.0.1 (AB-Sciex, Framingham, MA). La posterior identificación de péptidos y proteínas se realizó con el software Protein Pilot (version 5.0.1, Sciex) con una base de datos Swiss-Prot de proteínas humanas o de ratón (según sea el caso), concatenada real/reversa, dejando fijos algunos péptidos de la secuencia e invirtiendo otros, para evaluar la especificidad de los mismos y eliminar falsos positivos, utilizando un *false discovery rate* (FDR) del 1%. La búsqueda se realiza marcando alquilación de cisteínas como modificación y tripsina como enzima utilizada para la digestión.

## 3.6. Métodos de análisis de muestras

### 3.6.1. Extracción de ARN y cuantificación de ARNm por qRT-PCR

Se utilizaron muestras congeladas de células 3T3-L1 a diferentes estadios de diferenciación (0, 3, 6, 10 y 12 días) para extraer ARN total utilizando el método de TRIzol (Tri<sup>®</sup> Reagent, Invitrogen, Carlsbad, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Adicionalmente, se utilizaron muestras congeladas de tejido adiposo

humano, tanto visceral como subcutáneo, que fueron homogenizadas mecánicamente con un ULTRA-TURRAX T25 (IKA® Werke GmbH, Staufen, Alemania) utilizando TRIzol. Posteriormente, el ARN fue extraído de cada muestra utilizando el kit comercial *RNAeasy Lipid Tissue* (Qiagen, Madrid, España), controlándose su integridad y concentración (2100 *Bioanalyzer*, Agilent Technologies, Santa Clara, CA). El ARN total fue digerido con DNAsa RQ1 (Promega, Sydney, Nueva Gales del) previo a la RT-PCR. Los niveles de expresión de NECC2 y de ARN 18S ribosomal (rARN) como gen control, fueron medidos por PCR a tiempo real utilizando el Sistema iCycler™ *Real-Time PCR* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Específicamente, 1 µg de ARN total fueron sometidos a una transcripción inversa utilizando oligos aleatorios utilizando el kit *First Strand cDNA Synthesis* (Fermentas, Burlington, Ontario, Canada). Finalmente, la RT-PCR fue llevada a cabo con 1 µL de ADNc y 24 µL de mezcla de reacción [12,5 µL de 2x SYBR *Green Supermix* (BioRad), 9,5 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> libre de ARNasa y 1 µL de los *primers* correspondientes (ratón NECC2: sentido, 5'-GCCATCAACTCCACCATACA-3'; antisentido, 5'-TGGTCAGATTGGCGTTATCC-3', humano NECC2: sentido, GCGGGACAAGCTGTAAAGATTC; antisentido, AAGCCTCTTCGTCGTATCCAAA, 18S: sentido, 5'CCCATTCGAACGTCTGCCCTATC-3'; antisentido, 5'-TGCTGCCTTCCTTGGATGTGGTA-3')]. Para el análisis cuantitativo del ADNc, los datos de RT-PCR se procesaron siguiendo un método basado en curvas estándar (Pulido *et al.*, 2011). La expresión de NECC2 fue normalizada respecto a los transcritos del gen control. Todas las mediciones fueron llevadas a cabo por duplicado. En todos los ensayos se utilizaron controles negativos que no contenían ADNc. La fidelidad de la PCR fue determinada por un análisis de las temperaturas de fusión, el que consiste en verificar el la curva emitida por el SBYR *Green* mediante la temperatura de fusión de los oligos, para verificar que se genere un único pico en la lectura de emisión de fluorescencia y así comprobar la especificidad de los oligos.

### 3.6.2. Análisis de proteínas

#### 3.6.2.1. Obtención de extractos proteicos

Para los estudios de *immunoblotting* de los cultivos celulares, al final de los experimentos se eliminó el medio de las placas de cultivo y las células se lavaron

tres veces con PBS 0,01 M, pH 7,4, recogién dose con tampón de extracción RIPA [Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tritón X-100 1% (v/v), deoxicolato sódico 1% (m/v), SDS 0,1% (m/v), pH 7,4] suplementado con inhibidores de proteasas (PMSF 0,1 mM, quimostatina 5 µg/ml, leupeptina 5 µg/ml, antipaina 5 µg/ml, pepstatina A 5 µg/ml), en un volumen adecuado de tampón de extracción (entre 100-300 µl). A continuación, los extractos fueron homogeneizados con ayuda de una jeringa de 1 ml y aguja de 25-G. Los homogenados fueron incubados durante 30 min en hielo y sometidos a 3 pulsos de sonicación. Posteriormente, fueron centrifugados durante 10 min a 9.000 x g a 4 °C para eliminar restos celulares y los sobrenadantes fueron conservados a -20 °C hasta su análisis. Todo el proceso se llevó a cabo en hielo.

Los extractos proteicos para estudios funcionales de respuesta intracelular de NECC2 fueron obtenidos utilizando 300 µl de tampón de extracción SDS-DTT [Tris-HCl 62,5 mM, DTT 100 mM, SDS 2% (m/v), glicerol 20% (v/v), pH 7,6] que fue calentado previamente a 65 °C. A continuación los extractos proteicos fueron sometidos a 3 pulsos de sonicación, hervidos durante 5 min a 97 °C y guardados a -20 °C hasta su análisis.

Para la obtención de extractos proteicos de tejido humano (TAV y TASC) se utilizaron 50 mg de tejido que fueron sumergidos en 250 µl de tampón de lisis [Tris-HCl 20 mM pH 7,4; NaCl 150 mM; EDTA 1mM; Tritón X-100 (v/v); inhibidores de proteasas (CLAP 1 µl/ml y PMSF 1 µl/ml) 0,1%] a 4 °C. Posteriormente, para homogenizar los tejidos se colocaron en hielo y se utilizó un homogenizador de teflón dando 2 pulsos de 30 s cada uno y se los mantuvo en hielo durante 10 min. A continuación, los homogenados fueron sonicados 2 veces durante 15 s y se los dejó entre 10 y 15 min en hielo. Transcurrido este tiempo se los centrifugaron 15 min a 9.000 x g, generando tres fases: la fase superior que es una capa lipídica, la fase intermedia es la fracción proteica y, por último, un *pellet* correspondiente a restos nucleares. La fracción proteica fue recogida con cuidado de no mezclarla con lípidos y se la volvió a centrifugar durante 15 min a 9.000 x g y 4 °C, para eliminar los posibles lípidos contaminantes. Finalmente se cuantificó la cantidad de proteína utilizando el método de Bradford. Para estudios *de immunoblotting* las muestras fueron ajustadas a 1 µg/µl y se les añadió tampón de carga 5X [Tris-HCl 500 mM,

SDS 7,5% (m/v), EDTA 10 mM, sacarosa 50% (m/v),  $\beta$ -mercaptoetanol 5% (v/v), DTT 250 mM, azul de bromofenol 5 mg/ml, pH 6,8) y fueron hervidas durante 5 min a 97 °C previo su análisis.

### 3.6.2.2. Precipitación de proteínas

Para la precipitación de proteínas se utilizaron dos métodos diferentes, según el origen de las muestras.

El primero de ellos fue el método cloroformo/metanol, que permite la eliminación de restos de sales y detergentes de la muestra, se lo utilizó para precipitar las proteínas del fraccionamiento de caveolas. Para ello, y por cada 100  $\mu$ l de muestra, se añadieron por orden sucesivo 400  $\mu$ l de metanol, 100  $\mu$ l de cloroformo y 300  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O, mezclando siempre mediante vortex tras cada paso. La mezcla se centrifugó durante 1 min a 14.000 x g y se eliminó la capa acuosa superior. Posteriormente, se añadieron de nuevo 400  $\mu$ l de metanol y se centrifugó la mezcla durante 2 min a 14.000 x g. Finalmente, los restos de metanol fueron eliminados y secados a temperatura ambiente. El *pellet* resultante fue resuspendido en 40  $\mu$ l de tampón de carga 1,5X para su posterior análisis por *Western Blotting*.

La precipitación de proteínas por medio de acetona se utilizó para obtener las proteínas de las fracciones citólica y de membrana del fraccionamiento celular. En este protocolo las fracciones proteicas se incubaron en 4 volúmenes de acetona fría por cada volumen de proteína, y la mezcla resultante se mantuvo a -20 oC durante la noche. Al día siguiente, la mezcla fue centrifugada a 1.400 x g durante 10 min a 4 oC y el sobrenadante fue eliminado con cuidado para no perder el pellet. A continuación, se añadieron 100  $\mu$ l de metanol frío para eliminar la acetona y se centrifugó nuevamente a 1.400 x g durante 10 min a 4 oC. Finalmente, el metanol fue eliminado por secado y la pella resultante fue resuspendida en el tampón adecuado.

### 3.6.3. Electroforesis desnaturalizante y electrotransferencia

Las muestras de extractos y fracciones proteicas de concentraciones conocidas fueron preparadas para su separación electroforética añadiendo tampón de carga [Tris-HCl 500 mM, SDS 7,5% (m/v), EDTA 10 mM, sacarosa 50% (m/v),  $\beta$ -mercaptoetanol 5% (v/v), DTT 250 mM, azul de bromofenol 5 mg/ml, pH 6,8], fueron hervidas durante 5 min para desnaturalizar las proteínas de la muestra y finalmente fueron centrifugadas a 8.000 x *g* durante 5 min a 4 °C para eliminar los restos insolubles. Para la electroforesis desnaturalizante se cargaron 50  $\mu$ l de cada muestra en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). La electroforesis fue realizada en geles con un porcentaje de poliacrilamida del 7,5% ó 10%, dependiendo del peso molecular de la proteína a estudiar, utilizando el sistema de electroforesis Mini-PROTEAN Tetra (Bio-Rad). Para la migración de las proteínas se utilizaron 2 voltajes diferentes, un voltaje inicial de 80 V por 10 min, para posteriormente mantener un voltaje constante de 120 V hasta que el frente de migración llegara al final del gel. Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (BioTrace NT, Pall Corp., Pensacola, FL, EE.UU.) con un voltaje constante de 80 V durante 90 min y con recirculación continua del tampón de transferencia [Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS al 0,2% (m/v), metanol al 20% (v/v)]. Las membranas resultantes fueron teñidas con Rojo Ponceau [Ponceau S al 0,1% (m/v) en ácido acético al 1% (v/v)] durante 5 min para comprobar la transferencia correcta de las proteínas.

### 3.6.4. Inmunodetección y análisis densitométrico

Las membranas fueron desteñidas y bloqueadas durante 1 h con tampón de bloqueo [TBS (Tris-HCl 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5), Tween-20 al 0,05% (v/v) (TTBS) y leche en polvo (Carl Roth, Karlsruhe, Alemania) al 5% (m/v)]. Después, fueron incubadas con el anticuerpo primario correspondiente diluido en tampón de bloqueo toda la noche a 4 °C. Los diferentes anticuerpos primarios utilizados y sus características se resumen en la Tabla 6. A continuación, las membranas fueron lavadas tres veces durante 15 min cada vez con tampón de lavado [TBS



conteniendo *Tween-20* al 0,05% (v/v)] e incubadas con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (Sigma-Aldrich) diluido en tampón de bloqueo. Finalmente, las membranas fueron nuevamente lavadas tres veces durante 15 min con tampón de lavado. El revelado de la peroxidasa se llevó a cabo con el kit de detección de la peroxidasa basado en quimioluminiscencia (ECL-Plus GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido) y películas auto-radiográficas (BioMax XAR Kodak, Sigma-Aldrich) o mediante el equipo Image Quant LAS4000 (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido). Tras el revelado, las películas fueron digitalizadas y procesadas con el programa ImageJ 1.40v (NIH, EE.UU.) para realizar el análisis cuantitativo de las bandas inmunorreactivas mediante la cuantificación de la DO media de cada una. La normalización de carga de proteína en las diferentes calles fue realizada con la inmunotinción contra  $\beta$ -actina y la DO para la proteína de interés se refirió a aquella de  $\beta$ -actina. En los casos en que la normalización con  $\beta$ -actina no fue realizada, ya que ciertos tratamientos utilizados en este el estudio (i.e. insulina) afectan la cantidad de  $\beta$ -actina y por tanto su utilización como marcador de carga se ve afectada, ésta fue referida a la DO resultante de la tinción con Rojo Ponceau en cada calle.

**Tabla 6.** Anticuerpos primarios utilizados en los estudios de *Western Blotting*

Nombre	Origen	Dilución	Proporcionado por
Anti-NECC2-I	Conejo	1/1000	Abyntek Biopharma,S.L.
Anti-NECC2-II	Conejo	1/1000	Abyntek Biopharma,S.L.
Anti-Insulin receptor	Ratón	1/500	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Alemania)
Anti-Caveolina1	Ratón	1/1000	Novus Biologicals (Littleton, CO, EE.UU.)
Anti- $\beta$ -actina	Ratón	1/50000	Sigma-Aldrich
Anti-Tubulina	Ratón	1/100	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Akt	Conejo	1/1000	Cell Signaling (Danvers, MS, EE.UU.)
Anti-pAkt (Ser473)	Conejo	1/1000	Cell Signaling
Anti-Erk	Conejo	1/1000	Cell Signaling
Anti-pErk	Conejo	1/1000	Cell Signaling
Anti-Rab34	Conejo	1/2000	Abcam (Cambridge, Reino Unido)
Anti-GM130	Ratón	1/750	BD Bioscences (Bedford, MA, EE.UU.)
Anti-Perilipina	Cobaya	1/2000	Progen (Heidelberg, Alemania)
Anti-Arf1	Ratón	1/1000	Abcam
Anti-ADRP	Ratón	1/200	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Calnexina	Cabra	1/200	Santa Cruz Biotechnology
Anti-FAS	Cabra	1/200	Santa Cruz Biotechnology
Anti-HSL	Conejo	1/1000	Abcam
Anti-ATGL	Conejo	1/1000	Cusabio (College Park, MD, EE.UU.)
Anti-cMyc	Ratón	1/1000	AbD Serotec (Oxford, Reino Unido)

Anti-cMyc	Conejo	1/750	Cell Signaling
Anti-GFP	Conejo	1/2000	Abcam

### 3.7. Estudios de microscopía confocal

Las preparaciones destinadas a estudios de microscopía de fluorescencia fueron examinadas en un microscopio confocal LSM 5 Exciter (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania). Para la adquisición de la señal del fluorocromo Alexa 488 y la de GFP, las muestras fueron excitadas a 488 nm y se adquirió la fluorescencia emitida entre 500 y 550 nm. En el caso del fluorocromo Alexa 594, la excitación se realizó a 594 nm y se recogió la emisión entre 610 y 700 nm, mientras que para el fluorocromo Alexa 405, la excitación de la muestra se realizó a 405 y la emisión fue recogida entre 420 y 480 nm. Dependiendo de la localización de la señal fluorescente y del tamaño celular, se adquirieron entre 10 y 20 planos confocales por cada canal. El conjunto de todos los planos para cada célula y canal fueron sometidos a un proceso de deconvolución con el software Huygens Essential 4.3.1 (SVI, Hilversum, Holanda) y se procesaron y analizaron utilizando los programas ImageJ 1.40v o Imaris 7.4.2. Concretamente, se realizaron análisis de co-localización entre NECC2 o Rab34 con marcadores de varios orgánulos o componentes celulares (caveolas, citoesqueleto de actina, aparato de Golgi, vesículas ERGIC, vesículas Arf1/COPI, gotas lipídicas, etc) usando marcadores específicos para cada compartimento.

Para los estudios de localización de NECC2 y Rab34 se realizó la cuantificación de la señal específica de cada anticuerpo de, al menos, 10 células por condición utilizando programa ImageJ 1.40v. Por otro lado, para los estudios de co-localización de dos marcadores se adquirieron imágenes de al menos 10 células por condición experimental. Con los planos confocales de cada imagen se obtuvo una proyección máxima a partir de la cual se obtuvo el canal fusión de las emisiones fluorescentes correspondientes. Las imágenes fueron analizadas con el programa Imaris 7.4.2 para obtener el coeficiente de colocación Manders. Se consideró colocación entre dos señales cuando el índice de colocación de Mander superó un valor de 0,25 u.a.; por debajo de este valor se consideró que las señales fluorescentes no coincidían.

Finalmente, para los estudios de microscopía confocal de adipocitos humanos maduros, se realizó el protocolo de inmunocitoquímica detallado previamente (apartado 3.3.1.), con la diferencia que la solución con el anticuerpo primario se dejó durante toda la noche a temperatura ambiente en oscuridad y en todos los casos se utilizó el marcaje del núcleo con DAPI como referencia.

### **3.8. Estudios de videomicroscopía**

Para analizar en tiempo real el efecto de la insulina en la localización intracelular de Rab34 se utilizó videomicroscopía sobre células vivas 3T3-L1 transfectadas (a día 3) con el vector de expresión GFP-Rab34 y tratadas con ácido oléico (250  $\mu$ M, 18 h). Las células fueron visualizadas en un microscopio confocal LSM 710 Carl-Zeiss (Oberkochen, Alemania). Se tomaron imágenes cada minuto durante un período máximo de 2 h. Las series de imágenes fueron procesadas con los programas Huygens Professional 4.3.1., ImageJ 1.40v e Imaris 7.4.2. Durante todo el proceso las células fueron expuestas a un ambiente controlado de 37 °C con un 5% de CO<sub>2</sub>

### **3.9. Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los datos de los estudios de NECC2 fue realizado utilizando el software estadístico SPSS, versión 19.0 de Windows (SPSS Inc., Chicago, IL). La distribución normal de las variables fue juzgado utilizando el test de Kolmogorov-Smirnov y log-transformado de ser necesario. ANOVA de medidas repetidas (RM-ANOVA), ANOVA de una vía, *t-test* de muestras independientes fueron utilizados donde fueran apropiados. La corrección de Bonferroni se aplicó para pruebas múltiples. En RM-ANOVA, estudiamos: el efecto del tratamiento de insulina sola sobre el cambio en la variable independiente de la sobreexpresión de NECC2 o su silenciamiento (*P* time); el efecto de la sobreexpresión de NECC2 o su silenciamiento, independientemente del tratamiento de insulina (*P* transfección); y la interacción de ambos factores -NECC2 sobreexpresión/silenciamiento y tratamiento de insulina-, que es indicativo de la magnitud de la respuesta a la

insulina entre las células transfectadas con *mock* y GFP-NECC2 o entre las células transfectadas con shRNA *scrambled* y shRNA NECC2 ( $P$  tiempo x transfección). Un análisis post-hoc utilizando los test Turkey o Games-Howell's fue utilizado para identificar diferencias estadísticas entre grupos. La estadística de contraste se utilizó, cuando la esfericidad asumida no era satisfactoria se utilizó Huynh-Feldt. Valores de  $P < 0,05$  fueron tomados como estadísticamente significativos.

Los valores que se muestran en las figuras representan la media  $\pm$  SEM (error estándar de la media) de los resultados obtenidos a partir de al menos tres experimentos independientes realizados sobre cultivos celulares separados.

Para el análisis de datos de los estudios de Rab34, en aquellos estudios que se compararon únicamente dos grupos experimentales, se utilizó una prueba *t-test* para datos paramétricos o la prueba de U de *Mann-Whitney* para datos no paramétricos. En estudios con más de dos grupos experimentales, el análisis estadístico fue realizado empleando un ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparación de rangos múltiples de Newman-Keuls. Los análisis fueron realizados con el programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE.UU.). Las diferencias entre los grupos experimentales fueron considerados estadísticamente significativas a partir de un nivel de confianza superior al 95% ( $P < 0,05$ ).



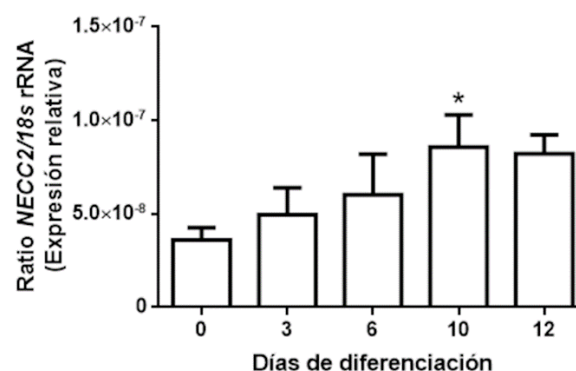
# RESULTADOS



## 4.1. Caracterización molecular de la proteína NECC2

### 4.1.1. Expresión y distribución de NECC2 durante la diferenciación de las células 3T3-L1

Iniciamos la caracterización de NECC2 en adipocitos analizando su patrón de expresión durante la adipogénesis, utilizando como modelo la línea celular 3T3-L1. Específicamente, se cuantificó el contenido de ARNm de *Necc2* a días 0, 3, 6, 10 y 12 de diferenciación mediante RT-PCR a tiempo real. La expresión del gen *Necc2* incrementó de forma progresiva durante el proceso de diferenciación en comparación con lo observado en células no diferenciadas, alcanzando su nivel más elevado y significativo desde el punto de vista estadístico a día 10 de diferenciación ( $P = 0,041$ ). A día 12 de diferenciación, se observó una ligera disminución en los niveles de ARNm de *NECC2* que, aunque se mantuvieron un 127% más elevados con respecto a las células no diferenciadas, dicho incremento no mostró diferencias significativas ( $P = 0,056$ ) (Fig. 18).



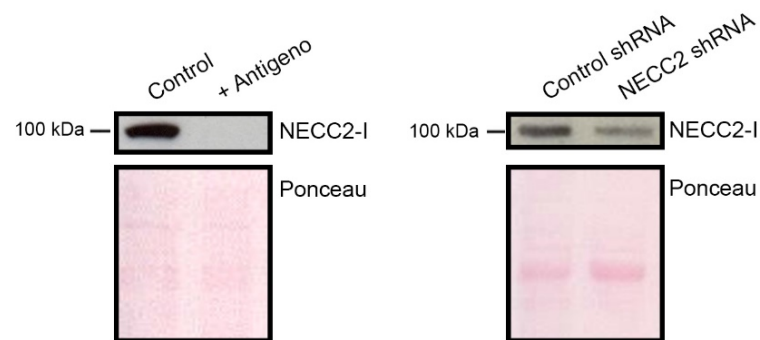
**Figura 18.** Niveles de expresión de ARNm de *Necc2* en células 3T3-L1 durante el proceso de diferenciación (0, 3, 6, 10 y 12 días). La expresión, que se determinó mediante RT-PCR cuantitativa, se muestra como el ratio de los niveles de transcritos del gen *Necc2* respecto a los del gen reportero, ARNr 18s. Los datos representan la media  $\pm$ SEM de cuatro experimentos independientes. Los datos fueron analizados utilizando un estadístico para muestras pareadas, *t* test. \*,  $P < 0,05$  vs. 0 días.

Adicionalmente, analizamos mediante inmunoblotting cuantitativo el contenido proteico de NECC2 utilizando un anticuerpo monoclonal generado para reconocer la zona N-terminal de la proteína (anti-NECC2-I) que empleamos previamente para la caracterización de esta proteína en células neuroendocrinas (Díaz-Ruiz A. *et al.*, 2013). Este anticuerpo reveló una banda de aproximadamente a

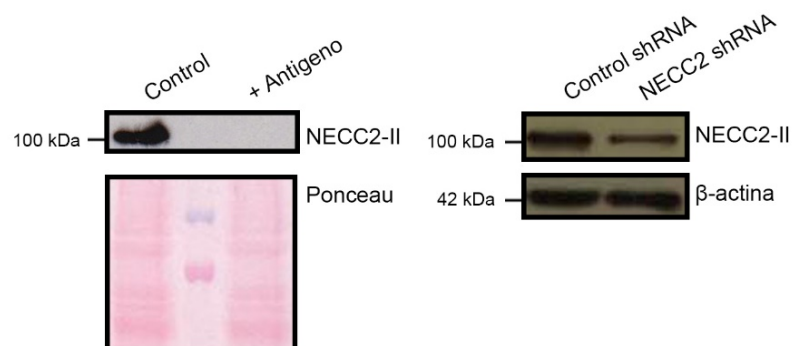


110-kDa en extractos de células 3T3-L1 (Fig. 18A), que corresponde al peso molecular esperado deducido a partir de la secuencia génica de *Necc2*. Por otra parte, también se utilizó un segundo anticuerpo policlonal generado para reconocer la región central de NECC2 (anti-NECC2-II) (Díaz-Ruiz A. *et al.*, 2013), que, al igual que el anticuerpo anti-NECC2-I, reveló una banda de peso molecular de en torno a 110 kDa cuando se aplicó en estudios de inmunoblotting de extractos proteicos de adipocitos 3T3-L1 (Fig. 18B). La señal de la proteína NECC2 en los blots fue abolida cuando se llevó a cabo la pre-adsorción del anticuerpo exponiendo el anticuerpo a concentraciones elevadas del antígeno purificado, y se redujo igualmente de forma significativa cuando se utilizaron extractos de células 3T3-L1 previamente electroporadas con el vector de silenciamiento para NECC2 (NECC2 shRNA) (Fig. 19).

**A**



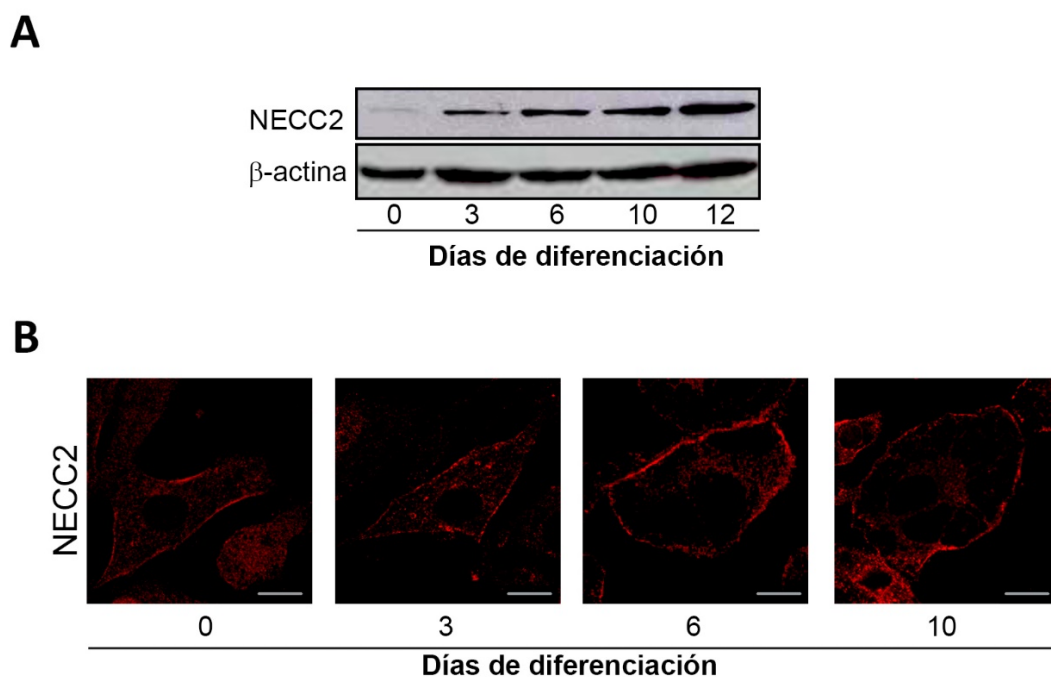
**B**



**Figura 19.** Análisis de especificidad de los anticuerpos anti-NECC2. (A y B) Análisis de inmunoblot para la proteína NECC2 utilizando el anticuerpo anti-NECC2-I (A) y anti-NECC2-II (B), y el correspondiente bloqueo de la banda inmunoreactiva tras pre-adsorción del anticuerpo con su antígeno purificado ( $10^{-6}$  M; A) o cuando el anticuerpo se aplicó a extractos de células expresando un vector de silenciamiento de *Necc2* (NECC2 shRNA) (B). Se utilizó la tinción de Ponceau y la inmunoseñal  $\beta$ -actina como controles de cantidad de proteína.

Una vez validados los anticuerpos, y de forma similar al estudio de expresión de ARNm, se analizó el patrón de expresión de NECC2 a nivel de proteína durante la adipogénesis (Fig. 20). Observamos un nivel bajo de proteína en células 3T3-L1 no diferenciadas, mientras que el contenido de NECC2 incrementó notoriamente después de 3 días de diferenciación y continuó incrementando hasta el día 12 de diferenciación (Fig. 20A).

Estudios de microscopía confocal en células 3T3-L1 revelaron que la inmunoseñal de anti-NECC2-I presenta fundamentalmente una localización difusa en el citoplasma de células 3T3-L1 no diferenciadas, aunque se puede apreciar además un inmunomarcaje concentrado en estrecha aposición a la membrana plasmática (Fig. 20B). Dicha distribución se mantuvo durante el proceso de adipogénesis, aunque la intensidad de la señal incrementó con el tiempo, especialmente en asociación a la membrana plasmática (Fig. 20B).

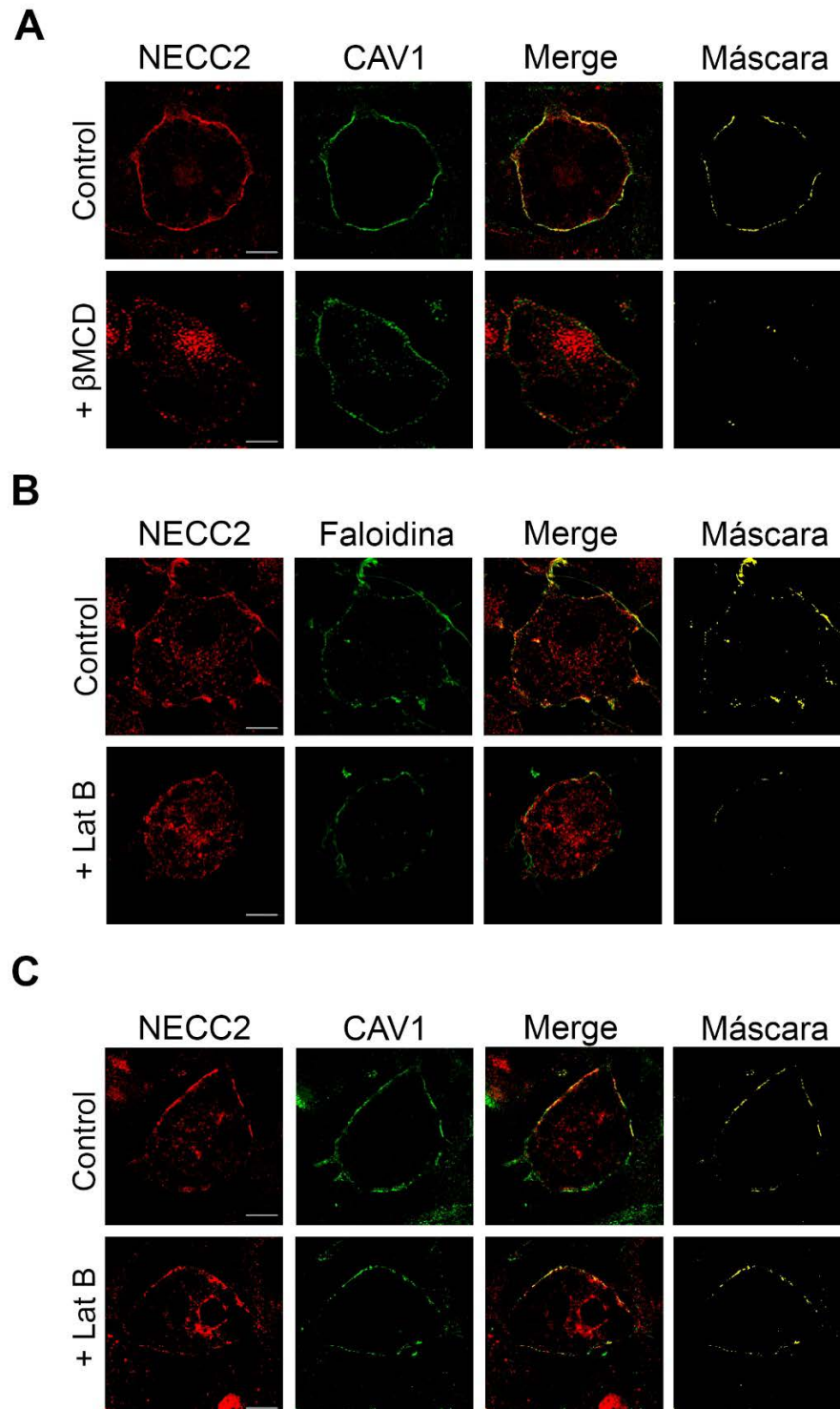


**Figura 20.** Análisis de expresión y localización de NECC2 en células 3T3-L1 durante el proceso de diferenciación. (A) Inmunoblot representativo del contenido de NECC2 en extractos de células 3T3-L1 a diferentes estadios de la adipogénesis. Se utilizó la señal de  $\beta$ -actina como control de carga. (B) Imágenes representativas de microscopía confocal de células 3T3-L1 inmunoteñidas para NECC2 a diferentes fases de diferenciación. Barra de escala, 10  $\mu$ m.

Teniendo en cuenta la similitud de las señales generadas por los anticuerpos anti-NECC2-I y anti-NECC2-II, tanto a nivel de inmunoblotting como de inmunocitoquímica, los estudios subsiguientes se realizaron utilizando el primer anticuerpo que, a partir de ahora, se denominará anti-NECC2 de forma genérica.

#### **4.1.2. Asociación de NECC2 a caveolas en adipocitos 3T3-L1**

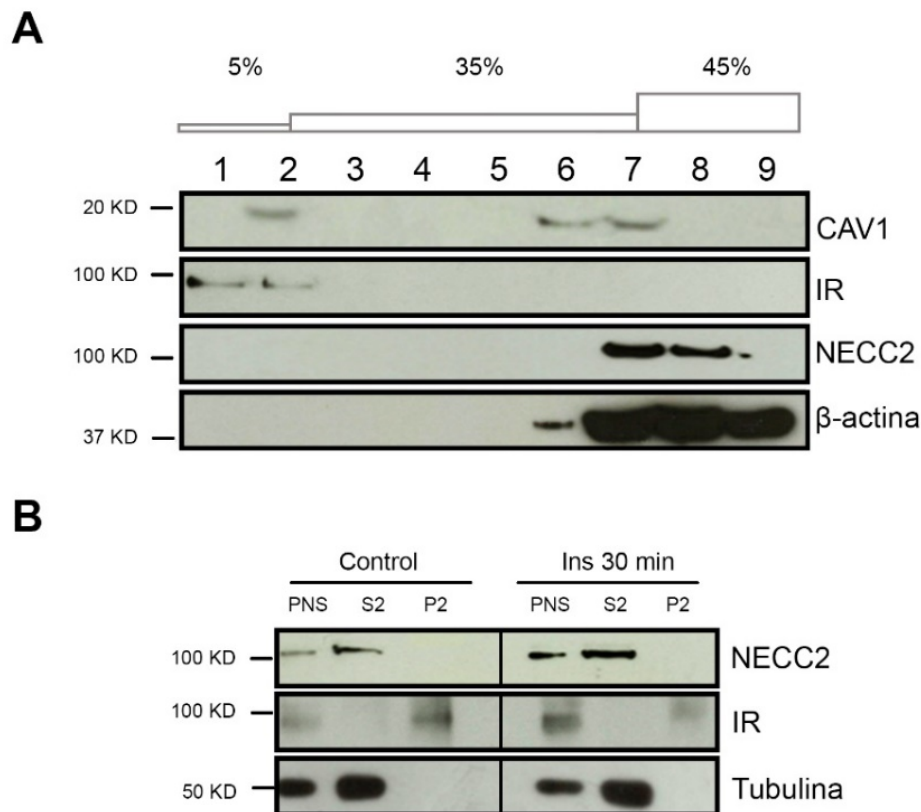
En estudios previos de nuestro laboratorio se ha demostrado que NECC2, que muestra dos dominios solapados de unión a caveolina (*caveolin-binding domain* o CBD) (Fig. 21), está asociado a caveolas en células neuroendocrinas PC12 (Díaz-Ruiz A. *et al.*, 2013). Dado este antecedente y la localización de la inmunoseñal de NECC2 en la superficie de las células 3T3-L1, se realizaron estudios de inmunocitoquímica doble en adipocitos 3T3-L1 usando anticuerpos contra el marcador de caveolas, CAV1, y el anticuerpo anti-NECC2-I. Las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal mostraron un alto grado de colocalización entre las inmunoseñales de NECC2 y CAV1 en la superficie celular [coeficiente de Manders (MC) =  $0,0959 \pm 0,005$ ] (Fig. 21A, panel superior). Además, un análisis de la secuencia de NECC2 también mostró cuatro sitios de unión a colesterol, denominados dominios CRAC (por sus siglas en inglés *cholesterol recognition/interaction amino acid consensus*) (Epan, 2008). Por consiguiente, examinamos la localización de NECC2 en caveolas en adipocitos 3T3-L1 expuestos a metil- $\beta$ -ciclodextrina, que extrae el colesterol de las membranas, provocando en particular la desorganización de las caveolas en virtud de su alto contenido en colesterol (referencia). Como se muestra en la Figura 21A, el tratamiento con metil- $\beta$ -ciclodextrina redujo la intensidad de las inmunoseñales tanto de NECC2 como de CAV1 en la membrana plasmática, lo que condujo a una pérdida en la colocalización entre las dos proteínas (MC =  $0,1277 \pm 0,1549$  vs.  $0,0913 \pm 0,1805$ ,  $P = 0,006$ ).



**Figura 21.** Estudios de localización de NECC2 en caveolas. (A) Imágenes de microscopía confocal de adipocitos 3T3-L1 bajo condiciones basales (panel superior) o tratadas con 10 mM ciclodextrina ( $\beta$ MCD) (panel inferior) durante 90 min, y co-inmunoteñidas con anticuerpos para NECC2 (rojo) y el marcador de caveolas, CAV1 (verde). La colocalización entre ambas señales se puede observar en el panel de la derecha (máscara). (B y C) Imágenes de microscopía confocal de adipocitos 3T3-L1 bajo condiciones basales (paneles superiores) o expuestos a 5  $\mu$ M latrunculina B (LatB) (paneles inferiores) durante 30 minutos, y doblemente teñidas para NECC2 (rojo) y (B) el marcador de actina, faloidina o (C) CAV1 (verde). El solapamiento entre ambos marcadores y NECC2 se muestra en los paneles de la derecha. Barra de escala, 10  $\mu$ m.

Por otro lado, también se exploró la potencial colocalización entre NECC2 con actina debido a la asociación demostrada entre este componente del citoesqueleto con las caveolas en adipocitos (Foti M, *et al.*, 2007). Este análisis mostró que la señal inmunoreactiva NECC2 también solapa con la de la actina cortical (MC =  $0,2026 \pm 0,00014$ ) (Fig. 21B, panel superior). Para confirmar la asociación de NECC2 con actina, los adipocitos 3T3-L1 fueron sometidos a un pretratamiento con latrunculina B, un inhibidor de la polimerización de las fibras de actina (Morton *et al.*, 2000) que, a pesar de disminuir el grado de solapamiento entre NECC2 y la actina cortical a nivel de membrana plasmática (MC =  $0,2026 \pm 0,00014$  vs.  $0,0637 \pm 0,0084$ ,  $P = 0,039$ ), no modificó la distribución de NECC2 en la membrana celular (Fig. 21B, panel inferior). De hecho, la despolimerización de los filamentos de actina inducida por latrunculina B en adipocitos 3T3-L1 no afectó la colocalización de NECC2 con CAV1 en la superficie celular (MC =  $0,1004 \pm 0,0098$  vs.  $0,1240 \pm 0,004$ ,  $P = 0,153$ ) (Fig. 21C). Estos datos muestran que NECC2 está asociado a caveolas en adipocitos 3T3-L1, pero que dicha asociación no es dependiente del citoesqueleto de actina.

Para profundizar en el estudio de la asociación de NECC2 con caveolas, se utilizó un protocolo libre de detergentes para aislar las fracciones de membrana enriquecidas en caveolina (Díaz-Ruiz A. *et al.*, 2013). Notablemente, la aplicación del anticuerpo anti-NECC2 a las diferentes fracciones generadas a partir del gradiente de sacarosa mostró que NECC2 endógeno no co-migra con CAV1 o el receptor de insulina (IR) hacia la fracción “*buoyant*” del gradiente (Fig. 22A). Estos resultados sugerían que NECC2 podría comportarse como una proteína de unión periférica a la membrana puesto que el tampón de lisis ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0,5 M, pH 11,0) utilizado en el protocolo para el aislamiento de caveolas sólo mantiene las proteínas integrales de membrana (Peiro S. *et al.*, 2000). Sin embargo, el análisis de inmunoblot del sobrenadante post-nuclear (PNS) y de las fracciones citosólica y cruda de membranas obtenidas de adipocitos 3T3-L1 indicaron que NECC2 es una proteína citosólica (Fig. 22B). Esta distribución de NECC2 fue observada tanto cuando las células 3T3-L1 se mantuvieron en condiciones basales como tras un tratamiento corto (30 min) con insulina (Fig. 22B). En conjunto, estos datos sugieren que NECC2 está localizado en caveolas, pudiendo formar parte de estos dominios de la membrana plasmática mediante su interacción con otras proteínas asociadas a caveolas.

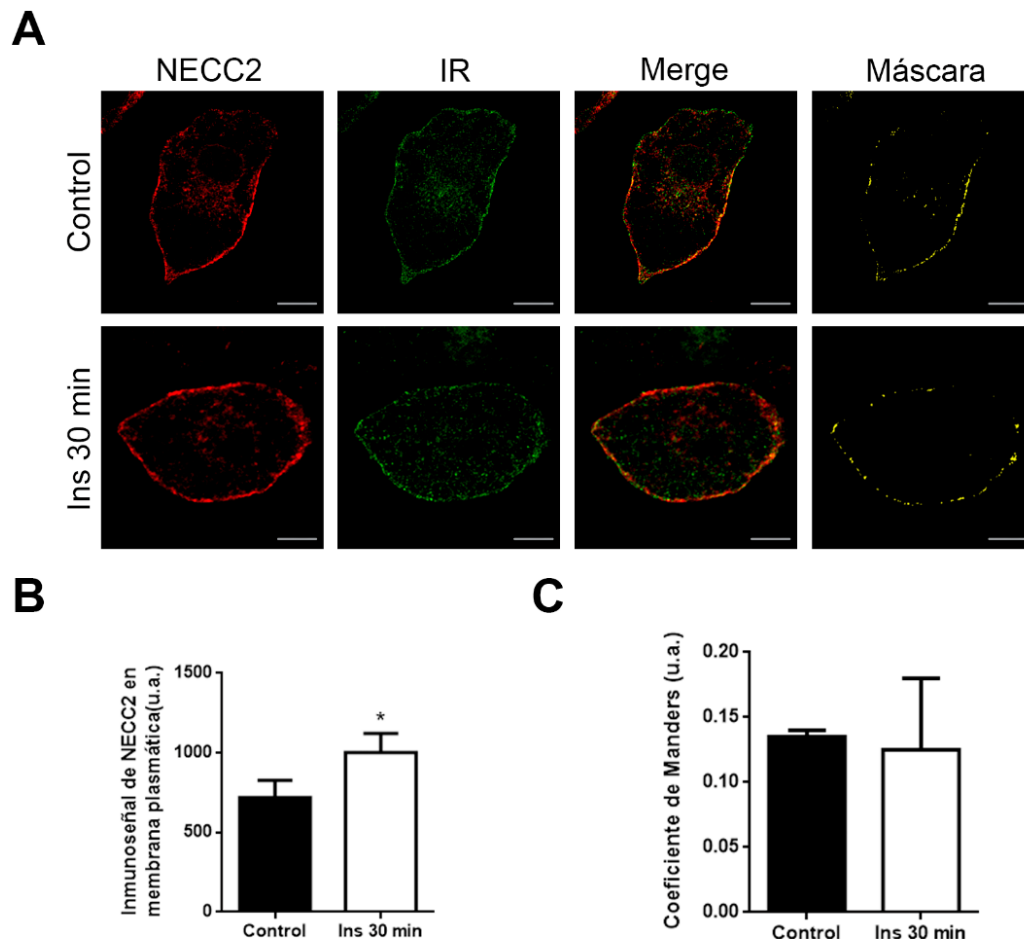


**Figura 22.** Análisis de la asociación de NECC2 a caveolas y distribución subcelular. (A) Análisis de la asociación de NECC2 con las membranas caveolares en células 3T3-L1. Se obtuvo un extracto crudo de células 3T3-L1 en tampón carbonato sódico (0,5 M, pH 11,0), que fue posteriormente sometido a separación en un gradiente discontinuo de sacarosa (35-5%). La ultracentrifugación a 120.000 x *g* permitió la separación de las caveolas, aisladas en las fracciones menos densas del gradiente (fracciones 1 y 2), del resto de estructuras celulares, que se mantuvieron en las fracciones 7, 8 y 9. La distribución de la proteína NECC2 en las 9 fracciones se analizó mediante western blotting. Como control interno, se analizó la distribución de las proteínas CAV1, receptor de insulina (IR) y  $\beta$ -actina (B) Análisis de la distribución de NECC2 mediante fraccionamiento subcelular. Los extractos post-nucleares de células 3T3-L1 en condiciones basales o tratadas con insulina (100 nM) durante 30 minutos (fracción PNS) fueron ultracentrifugados a 165.000 x *g* para obtener la fracción cruda de membrana (P2) en la pella y la fracción citosólica (S2) en el sobrenadante. La distribución de NECC2 en las diferentes fracciones se analizó mediante western blotting. A partir de estas muestras se analizó la distribución de las proteínas IR y tubulina como controles internos.

#### 4.1.3. La insulina regula la distribución de NECC2 en adipocitos 3T3-L1

Además de los estudios de fraccionamiento celular, se investigó la distribución intracelular de NECC2 tras la estimulación de adipocitos 3T3-L1 con insulina mediante inmunocitoquímica y microscopía confocal. Estos estudios mostraron que un tratamiento a corto plazo con insulina (30 min, 100 nM) de los adipocitos 3T3-L1 incrementa la acumulación de la señal inmunorreactiva para NECC2 en la superficie celular ( $P = 0.023$ ) (Figs. 23 A y B). Por otro lado, dado que en adipocitos el receptor

de insulina (IR) está presente en caveolas (Gustavsson *et al.*, 1999), se estudió la posible colocalización entre IR y NECC2 en la membrana plasmática. Para ello, se realizó un estudio de doble inmunofluorescencia en adipocitos 3T3-L1 utilizando anticuerpos contra NECC2 e IR en condiciones basales y tras la exposición de las células a insulina 100 nM durante 30 minutos. Los adipocitos fueron visualizados al microscopio confocal, observándose un alto grado de solapamiento entre NECC2 e IR en condiciones basales en la membrana plasmática. Por su parte, en células expuestas a insulina se observó una tendencia, aunque no significativa, a disminuir el ratio de colocalización entre ambas proteínas (MC =  $0.0693 \pm 0.0593$  vs.  $0.0436 \pm 0.0256$ ,  $P = 0.589$ ) (Fig. 23C).

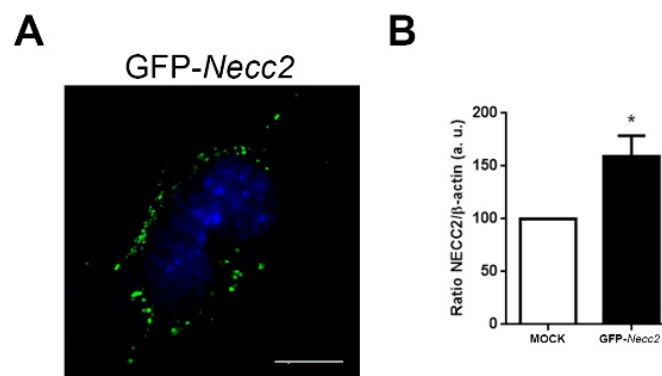


**Figura 23.** Regulación de la distribución de NECC2 en adipocitos 3T3-L1 en respuesta al tratamiento con insulina. (A) Imágenes de microscopía confocal de adipocitos 3T3-L1 en condiciones basales (panel superior) o tratadas con insulina (100 nM) durante 30 minutos (panel inferior). Tras el tratamiento, las células fueron co-inmunoteñidas para NECC2 (rojo) e IR (verde). La colocalización resultante se muestra en las imágenes de la derecha (máscara). (B) Se cuantificó la inmunosíñal de NECC2 a nivel de membrana en células en condiciones basales (Control) o expuestas a insulina 100 nM (Ins 30 min) de al menos 10 células por condición. La síñal de NECC2 se expresa como unidades arbitrarias (u.a.).

(C) Medida de la colocalización entre NECC2 e IR mediante la determinación del coeficiente de Manders, que se representa como la media  $\pm$  SEM, de un mínimo de 10 células por condición y se expresa en unidades arbitrarias (u.a.). \*  $P < 0.05$  vs. Células no tratadas (Control). Barra de escala, 10  $\mu\text{m}$ .

#### 4.1.4. NECC2 regula la señalización de insulina en adipocitos

Las observaciones morfológicas demostrando la colocalización de NECC2 con CAV1 e IR en la superficie celular sugerían un posible papel de esta proteína en la regulación de las funciones asociadas a caveolas, en particular, de la señalización de insulina. Para explorar esta posibilidad, analizamos el efecto de la manipulación de los niveles de expresión de NECC2 sobre dos intermediarios fundamentales en la señalización de insulina en adipocitos, ERK1/2 y Akt (Taniguchi CM. *et al.*, 2009). Concretamente, evaluamos el efecto de la sobreexpresión y el silenciamiento de NECC2 sobre el contenido proteico y el ratio de fosforilación de ERK1/2 y Akt en adipocitos 3T3-L1 en respuesta a la exposición a insulina a diferentes tiempos (0-20 min). Para ello, con el objetivo de incrementar la expresión de NECC2, los adipocitos 3T3-L1 fueron electroporados con un vector de expresión que codifica para GFP-*Necc2*, que incrementa el contenido de la proteína NECC2 en un 59% (Fig. 24).

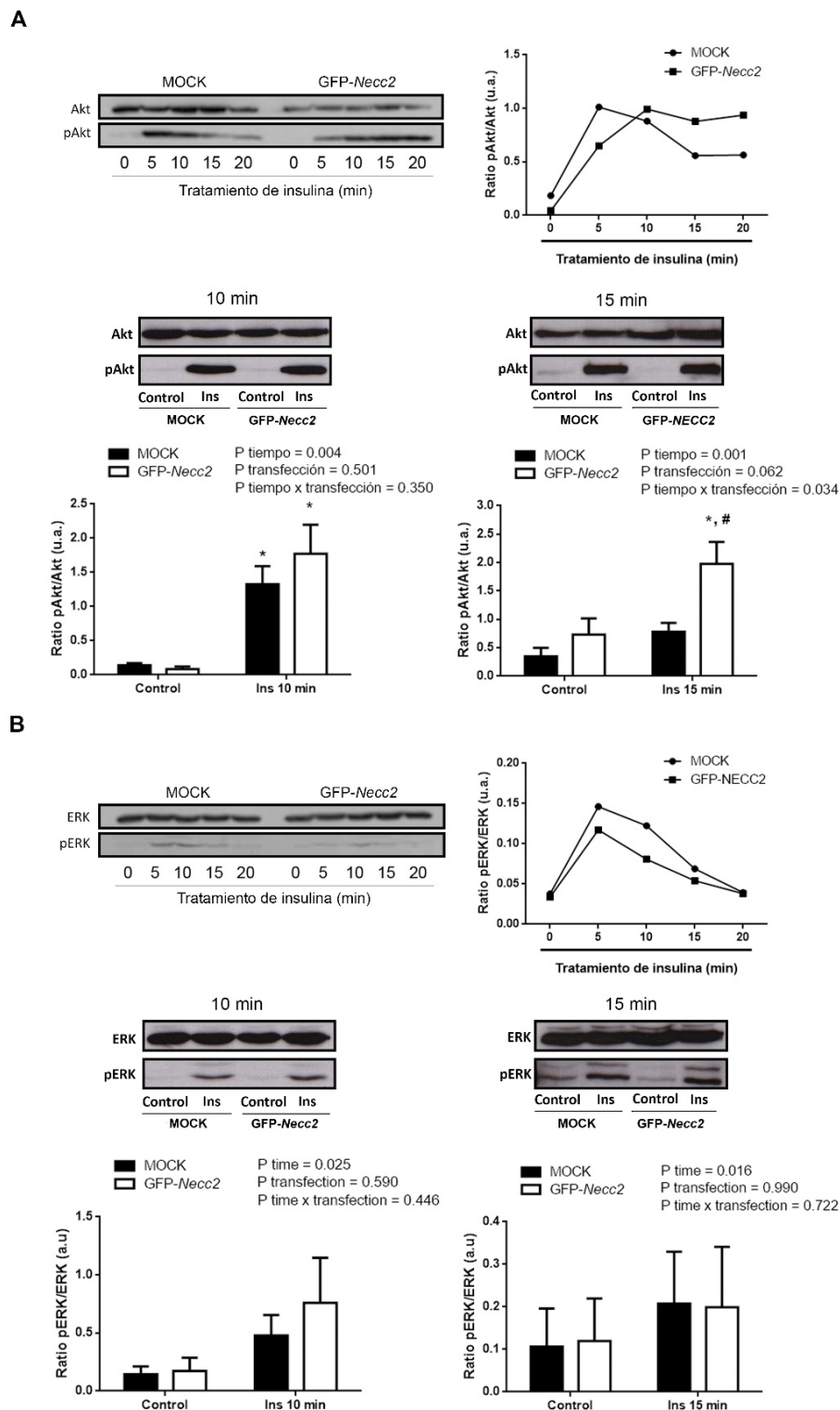


**Figura 24.** Estudio de sobreexpresión de NECC2 en células 3T3-L1 a día 6 de diferenciación. (A) Imagen representativa de microscopía confocal de célula 3T3-L1 electroporada con el vector GFP-*Necc2*. Barra de escala 10  $\mu\text{m}$ . (B) Cuantificación de la expresión de NECC2. Los datos están expresados como la media  $\pm$  SEM de cinco experimentos independientes  $P < 0,05$  vs. células MOCK (control).

Este incremento en la concentración de NECC2 no modificó el contenido total de Akt pero sí generó una fosforilación más sostenida de Akt comparada con las células transfectadas con el vector control (*mock*) (Fig. 25A). Específicamente, mientras que el ratio de fosforilación de Akt estaba por encima de los niveles basales

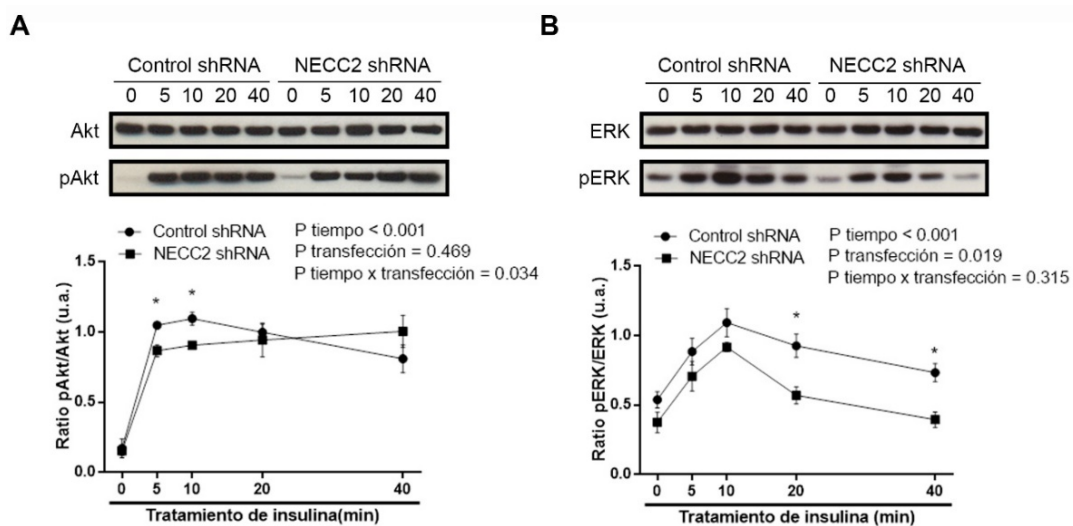


tanto en células transfectadas con GFP-NECC2 como las células *mock* a los 10 minutos de exposición a insulina ( $P < 0.05$ ), solamente los adipocitos 3T3-L1 sobreexpresando NECC2 mostraron una activación de Akt a los 15 minutos de estimulación con insulina ( $P = 0.029$ ). Por otro lado, el ratio de fosforilación de ERK1/2 no se vio modificado en células que sobreexpresaban NECC2 comparadas con las células control en ninguno de los tiempos analizados (Fig. 25B).



**Figura 25.** Estudio del efecto de la sobreexpresión de NECC2 sobre la señalización de insulina. Análisis mediante western blotting de los niveles de proteína (A) Akt total y Akt fosforilada (pAkt) o (B) ERK total y ERK fosforilada (pERK) en células 3T3-L1 electroporadas con GFP-Necc2, o el vector vacío (MOCK) expuestas a insulina 100 nM durante 5, 10, 15 ó 20 minutos. Los datos corresponden a la media  $\pm$ SEM de al menos 3 experimentos independientes. \*,  $P < 0.05$  vs. células no tratadas correspondientes (control); #,  $P < 0.05$  vs. células MOCK tras el tratamiento con insulina.

Posteriormente, se examinó el efecto del silenciamiento de NECC2 sobre Akt y ERK1/2, totales y fosforiladas. Para ello, se electroporaron células 3T3-L1 con vectores de expresión que codifican un shRNA de *Necc2*, el cual disminuyó la concentración de NECC2 en un 44%. La disminución en la expresión de NECC2 generó una disminución en la fosforilación de Akt (Fig. 26A) y ERK1/2 estimulada por insulina (Fig. 26B). Específicamente, la actividad de Akt, medida como el ratio entre pAkt/Akt total, fue significativamente menor a los 5 y 10 min de exposición a insulina en células silenciadas comparadas con las células control tratadas con shRNA. El ratio de fosforilación de ERK1/2 también disminuyó en células silenciadas en todos los tiempos estudiados. A pesar de ello las diferencias entre las células tratadas con NECC2-shRNA y control-shRNA solo fueron significativas después de 20 y 40 min de estímulo con insulina. Estos resultados en conjunto con los observados en la sobreexpresión de NECC2, apuntan a su participación en distintas vías intracelulares de la ruta de señalización de insulina: la relacionada con la activación de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)-Akt y la que activa la ruta de Ras-MAPK (Taniguchi *et al.*, 2009).

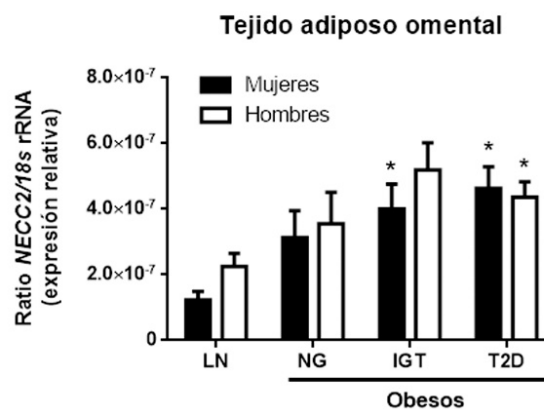


**Figura 26.** Estudio del efecto del silenciamiento de NECC2 en la ruta de señalización de insulina. Análisis mediante western blotting de los niveles de proteína (A) Akt total y Akt fosforilada (pAkt) o (B) ERK total y ERK fosforilada (pERK) en células 3T3-L1 electroporadas con shRNA para *Necc2* (NECC2 shRNA), o shRNA control expuestas a insulina 100 nM durante 5, 10, 20 y 40 minutos. Os datos muestran la media  $\pm$ SEM de cinco experimentos independientes, \*,  $P < 0.05$  vs. correspondiente tiempo en células transfectadas con el shRNA control.

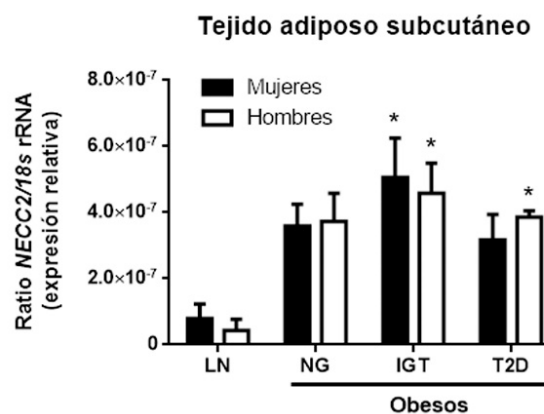
#### 4.1.5. La expresión de NECC2 en el tejido adiposo está modulada en respuesta a obesidad y trastornos metabólicos

Posteriormente, la expresión de NECC2 fue medida en tejido adiposo humano, tanto en el depósito omental como en el subcutáneo, de sujetos delgados y obesos. Este último grupo fue dividido en obesos normoglucémicos (NG), con intolerancia a glucosa (IGT) o con T2D. El análisis de RT-PCR mostró que el gen de *NECC2* está expresado en ambos tipos de tejidos, siendo los niveles de ARNm significativamente más elevados en sujetos obesos respecto a los delgados, independientemente del tipo de depósito graso y del sexo de los individuos ( $P < 0.05$ ) (Fig. 27 A y B). Además, el análisis de estos resultados separados por depósito adiposo y por género mostró que tanto hombres como mujeres se comportan de la manera similar.

**A**



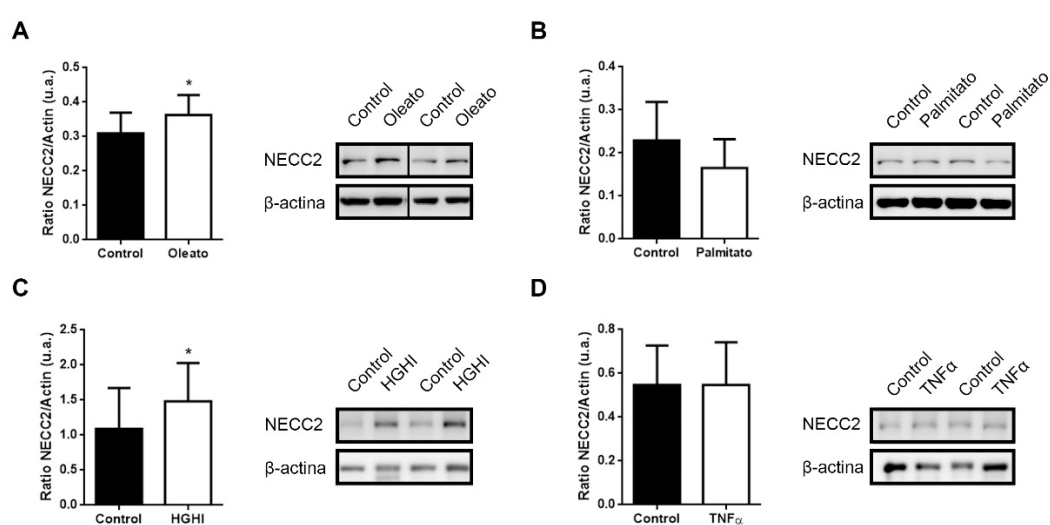
**B**



**Figura 27.** Niveles de expresión de NECC2 en tejido adiposo humano en relación con obesidad y resistencia a insulina. Muestras de tejido adiposo omental y subcutáneo de hombres y mujeres fueron

obtenidas de pacientes con diferentes grados de obesidad y sensibilidad a insulina: delgados (LN), obesos normoglucémicos (NG), obesos con intolerancia a la glucosa (IGT), y obesos con diabetes tipo 2 (T2D). (A y B) La expresión del gen NECC2 fue evaluada por RT-PCR utilizando *primers* específicos para NECC2 humano. La expresión de 18s ARNr en cada muestra fue evaluada como gen reportero interno. \*,  $P < 0.05$  vs. sujetos delgados relacionados al sexo.

Finalmente, se llevó a cabo el análisis de la expresión de NECC2 *in vitro* en modelos celulares que simulan las condiciones patofisiológicas de obesidad y resistencia a insulina y que fueron caracterizados por nuestro laboratorio en un estudio previo (Díaz-Ruiz A. *et al.*, 2015). Concretamente, este estudio se realizó a partir de extractos proteicos de adipocitos 3T3-L1 que habían sido expuestos a los siguientes tratamientos *in vitro*: a) inducción de hipertrofia celular mediante sobrecarga de los ácidos grasos oleato o palmitato, b) simulación del estado de hiperglucemia e hiperinsulinemia característico en la evolución de la resistencia a insulina mediante tratamientos con alta glucosa y alta insulina (HGHI) y c) simulación del ambiente proinflamatorio que aparece en el tejido adiposo en obesidad mediante tratamiento de las células con TNF- $\alpha$ . Estos experimentos *in vitro* revelaron que la exposición de los adipocitos 3T3-L1 con una sobrecarga de oleato o a HGHI incrementaron significativamente los niveles de la proteína NECC2, resultando en un 17% y un 36% de incremento sobre las condiciones basales, respectivamente (Fig. 28 A y C). En contraste, la exposición de las células a palmitato o TNF- $\alpha$  no alteraron la expresión de la proteína NECC2 (Fig. 28 B y D).



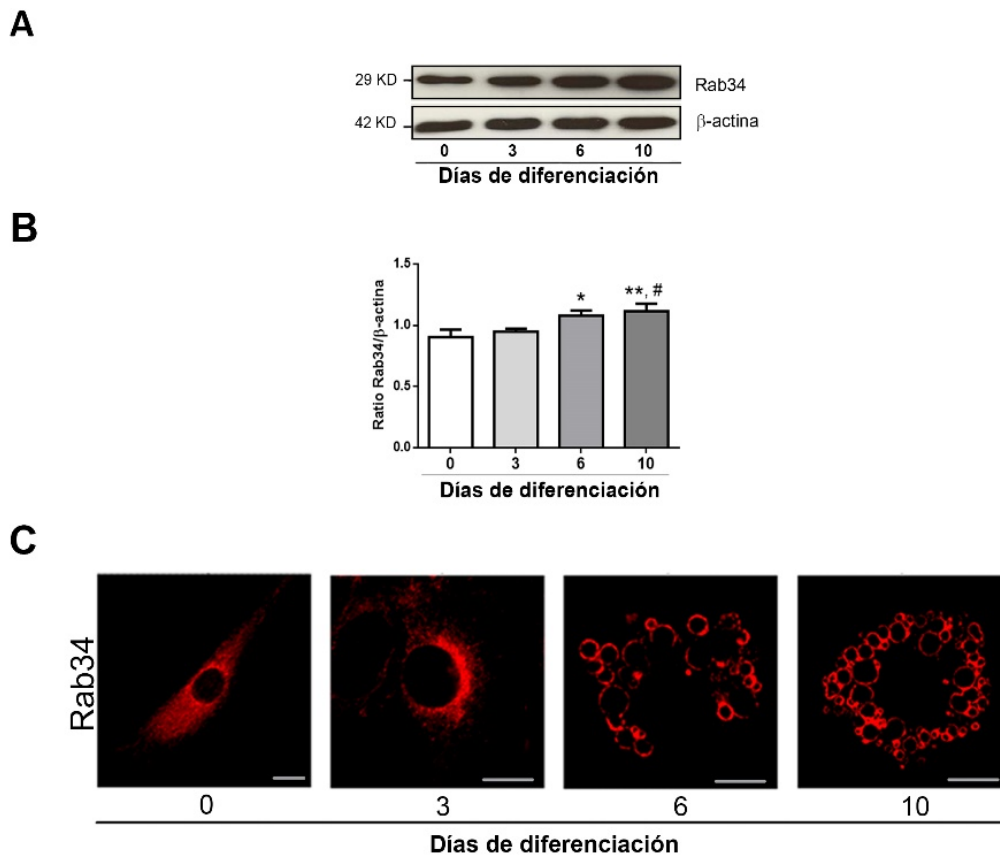
**Figura 28.** Expresión de NECC2 en modelos celulares de obesidad y resistencia a insulina en adipocitos 3T3-L1. Diferentes estímulos metabólicos que generan hipertrofia y/o condiciones de resistencia a

insulina [500  $\mu$ M oleato y 500  $\mu$ M palmitato, 18 h (A y B), alta glucosa (4.5 g/L)/ alta insulina (100 nM) (HGHI) o 5 nM TNF- $\alpha$  durante 24 h, (C y D)]. Los datos expresan la media  $\pm$ SEM de al cinco experimentos independientes. \*,  $P < 0.05$  vs. Control.

## 4.2. Caracterización molecular de la proteína Rab34

### 4.2.1. Expresión y localización intracelular de Rab34 durante el proceso de diferenciación

En primer lugar, se analizó el patrón de expresión de Rab34 durante el proceso de adipogénesis utilizando células 3T3-L1 a distintos tiempos en el proceso de diferenciación (días 0, 3, 6 y 10) (Fig. 29A). La evaluación del nivel de Rab34 en extractos proteicos por immunobloting reveló un aumento progresivo de la cantidad de proteína a lo largo del proceso de diferenciación, siendo el aumento estadísticamente significativo a partir del día 6 de diferenciación ( $P < 0.05$ ) (Fig.29B). De manera interesante, nuestros estudios en inmunofluorescencia y microscopía confocal demostraron que Rab34 sufre un cambio en su distribución intracelular durante el proceso de diferenciación (Fig. 29C). Concretamente, Rab34 mostró una localización predominantemente tubular, acumulándose en estructuras yuxtenucleares reminiscentes del aparato de Golgi (días 0 y 3 de diferenciación) (Fig. 29C). Sin embargo, en células que exhibían GLs (día 6 de diferenciación en adelante), Rab34 se encontró claramente asociado a la superficie de estos orgánulos (Fig. 29C).

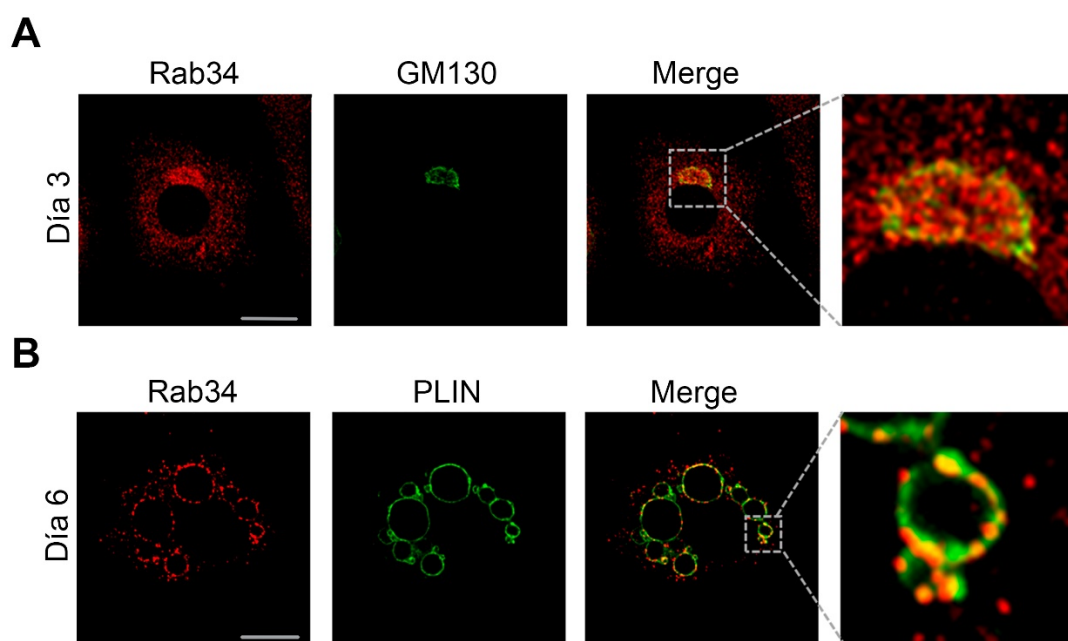


**Figura 29.** Análisis de expresión y localización de Rab34 en células 3T3-L1 durante el proceso de diferenciación. (A) Inmunoblot representativo del contenido de Rab34 en extractos de células 3T3-L1 durante su diferenciación (días 0, 3, 6 y 10), que muestran que Rab34 incrementa su expresión a medida que avanza la diferenciación. La señal de  $\beta$ -actina fue utilizada como control de carga. (B) Estudio cuantitativo de Rab34 durante el proceso de diferenciación de células 3T3-L1 expresado en el ratio de la inmunoseñal de Rab34 respecto a la de  $\beta$ -actina expresado como la media  $\pm$ SEM de al menos cuatro réplicas biológicas. \*,  $P < 0,05$  vs. día 0; \*\*,  $P < 0,01$  vs. día 0; #,  $P < 0,05$  vs. día 3. (C) Imágenes representativas de confocal de células 3T3-L1 inmunoteñidas para Rab34 durante la diferenciación. Rab34 se localiza en una posición yuxtannuclear a días tempranos de diferenciación (días 0 y 3) y se redistribuye a la superficie de gotas lipídicas (GLs) tan pronto como estos orgánulos aparecen en la célula (día 6 en adelante). Barra de escala, 10  $\mu$ m.

#### 4.2.2. El proceso de diferenciación adipocitaria induce la translocación de Rab34 desde el aparato de Golgi a la superficie de GLs.

Estudios previos sobre Rab34 en células Hela y células normales de riñón de rata (NRK), han descrito que esta proteína se encuentra presente en el aparato de Golgi y que está implicada en el desplazamiento de los lisosomas hacia el centro organizador de microtúbulos (MTOC) (Wang y Hong, 2002). En línea con estos resultados, nuestros estudios de doble inmunocitoquímica mostraron que Rab34 co-localiza con el marcador del *cis*-Golgi, GM130 a días tempranos de diferenciación

(días 0 y 3) (Fig. 30). En cambio, tan pronto como las células 3T3-L1 comienzan a presentar GLs en su citosol, característica esencial de su compromiso de diferenciación a adipocitos (Ntambi y Young-Cheul, 2000), la inmunoreactividad de Rab34 apareció preferentemente asociada a la superficie de estos orgánulos. En la Figura 29 se muestra una imagen confocal representativa de un adipocito 3T3-L1 a día 6 de diferenciación que contiene un número determinado de GLs positivas para el marcador específico de estos orgánulos, PLIN1 (verde), en cuya superficie aparece a menudo inmunomarcaje de Rab34 (rojo).



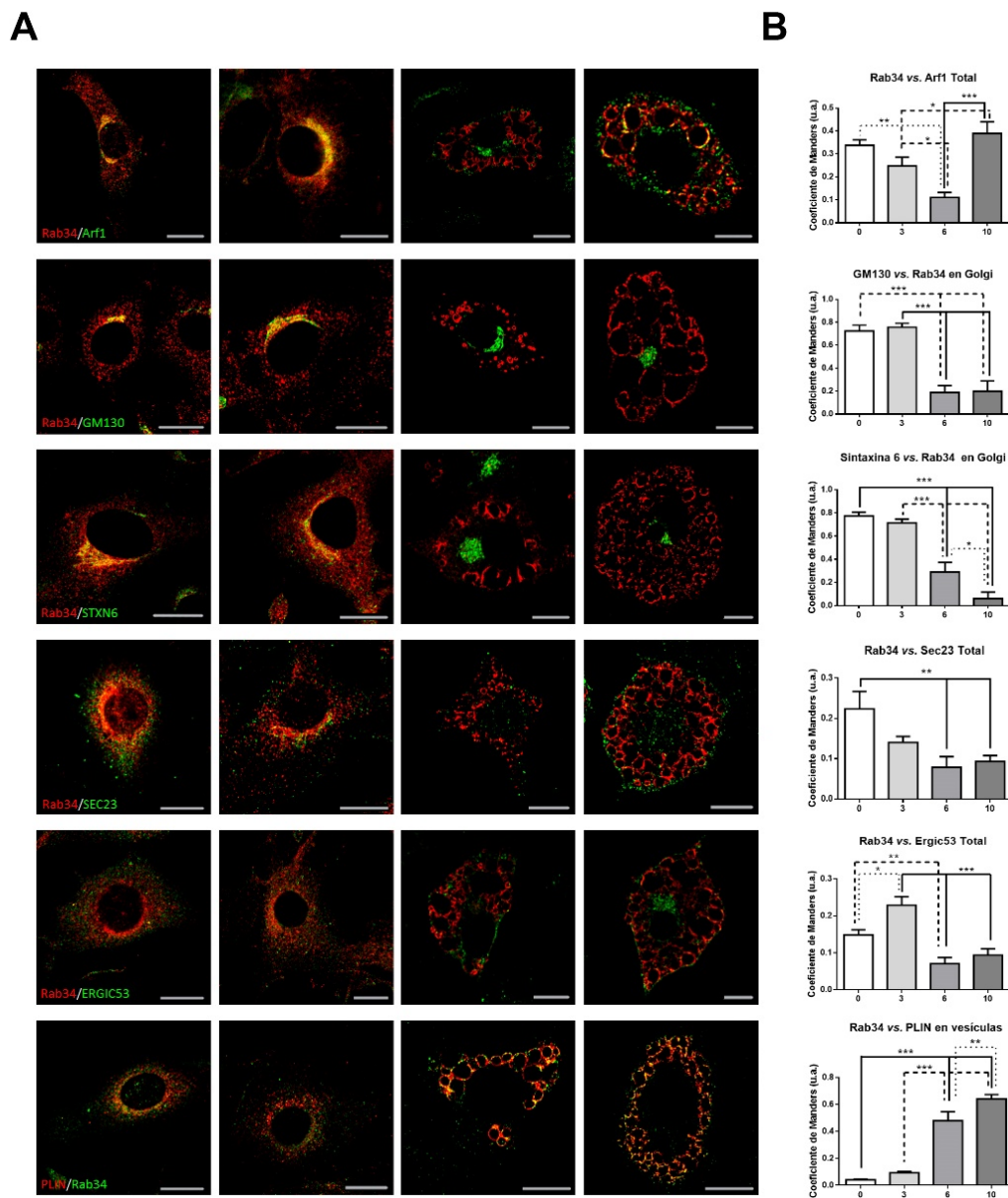
**Figura 30.** Análisis de redistribución de Rab34 durante el proceso de diferenciación en células 3T3-L1. (A) Células 3T3-L1 fueron doble-inmunoteñidas con los anticuerpos anti-Rab34 y el marcados de *cis*-Golgi, GM130 o (C) el marcador de GL, PLIN1 a día 3 y 6 de diferenciación respectivamente. Barra de escala, 10 $\mu$ m.

Dado el papel general de los miembros de la familia de GTPasas de bajo peso molecular Rab en la regulación del tráfico intracelular de membranas (Stenmark, 2009), sería razonable pensar que Rab34 podría mediar el transporte de ciertas proteínas de la cubierta de las GL desde el aparato de Golgi hasta la superficie de estos orgánulos. En este sentido, existe hoy en día un amplio debate de cómo las proteínas las proteínas que decoran la cubierta de las GL alcanzan su destino. Por ejemplo, algunos estudios han revelado que la lipasa que hidroliza los triglicéridos



del tejido adiposo (ATGL) accede a la GL desde un compartimento intermedio entre el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico, denominado ERGIC, y esto ocurre vía vesículas del complejo COPI/Arf1, encargadas del transporte retrógrado entre estos orgánulos. (Soni *et al.*, 2009). Para investigar si Rab34 participa en este proceso concreto, se exploró el grado de colocalización de la GTPasa con un marcador de las vesículas COPI/Arf1 (Arf1), así como con un marcador específico del compartimento ERGIC (ERGIC53), durante el proceso de adipogénesis (Fig. 31). En primer lugar, se analizó la dinámica temporal del tráfico de Rab34 desde el aparato de Golgi a las GL durante la adipogénesis. Para ello, se estudió la inmunoseñal de Rab34 en combinación con la de GM130 y PLIN1 en distintos estadios de diferenciación, pudiéndose confirmar que, efectivamente, Rab34 sufre un proceso de translocación desde el aparato de Golgi a la superficie de GL tan pronto como estas empiezan a aparecer en el citosol (día 6 en adelante) (Fig. 31). Además, este estudio mostró que Rab34 colocaliza fuertemente con Arf1 en membranas del aparato de Golgi en etapas tempranas de diferenciación y que posteriormente se disocia de éste (día 6), a medida que aumenta la cantidad de Rab34 asociado al compartimento ERGIC, para finalmente ser transferida a las GLs cuando estos orgánulos aparecen en las células 3T3-L1. Concretamente, Rab34 coincidió con Arf1 en membranas del aparato de Golgi en células no diferenciadas, así como en la superficie de GLs en adipocitos, lo que parecería indicar que el mecanismo de transporte de estas proteínas desde el aparato de Golgi a las GLs es común. Sin embargo, en etapas intermedias de diferenciación (días 3 y 6), Rab34 dejó de colocalizar con Arf1 (Fig. 31), lo que apunta a que la translocación de la GTPasa a la superficie de las GLs es independiente del mecanismo de transporte vesicular mediado por el complejo COPI/Arf1. Para profundizar en este aspecto, analizamos asimismo la colocalización de Rab34 con otros marcadores relacionados con rutas de tráfico intracelular de membranas, como el marcador de la red *trans* del aparato de Golgi syntaxin 6 (Jung *et al.*, 2012) y el marcador del tráfico vesicular anterógrado entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi Sec23 (Fromme *et al.*, 2008). Como se puede observar en las imágenes de microscopía confocal mostradas en la Figura 31, Rab34 colocalizó modestamente con ambos marcadores en células no diferenciadas, mientras que perdió dicha co-localización a partir del día 6. En conjunto, estos datos sugieren que Rab34 podría jugar un papel

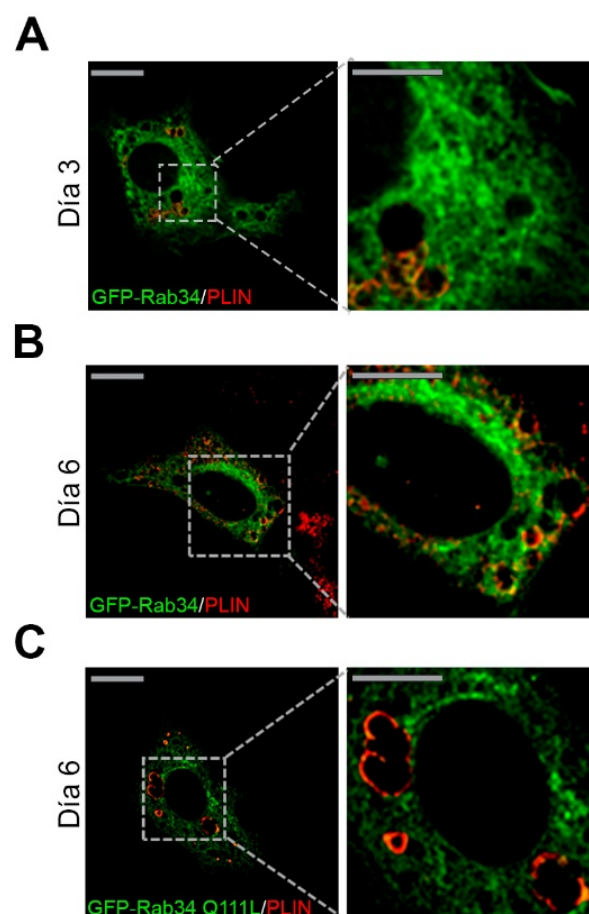
dual en Golgi y gotas lipídicas, ayudando a mantener la arquitectura y/o funcionalidad de estos orgánulos.



**Figura 31.** Estudio de colocalización de Rab34 con orgánulos celulares durante el proceso de diferenciación de células 3T3-L1. Las células 3T3-L1 fueron co-inmunoteñidas con Rab34 y diferentes marcadores intracelulares [Arf1, GM130, sintaxina 6 (STNX6), SEC23, ERGIC53 y PLIN1]. (A) Imágenes representativas de microscopía confocal a días 0, 3, 6 y 10 de diferenciación. Barra de escala, 10  $\mu$ m. (B) Índice de colocalización de Rab34 con los diferentes marcadores intracelulares durante el proceso de diferenciación de células 3T3-L1, cuantificado como el coeficiente de Manders de al menos 12 células por condición y expresado como la media  $\pm$  SEM. \*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$ , \*\*\*,  $P < 0,001$ .

Paralelamente, también se realizaron estudios sobre la sobreexpresión de la proteína Rab34 y de su mutante constitutivamente activo (Rab34Q111L) en adipocitos 3T3-L1. Para ello, las células fueron transfectadas a día 3 o electroporadas

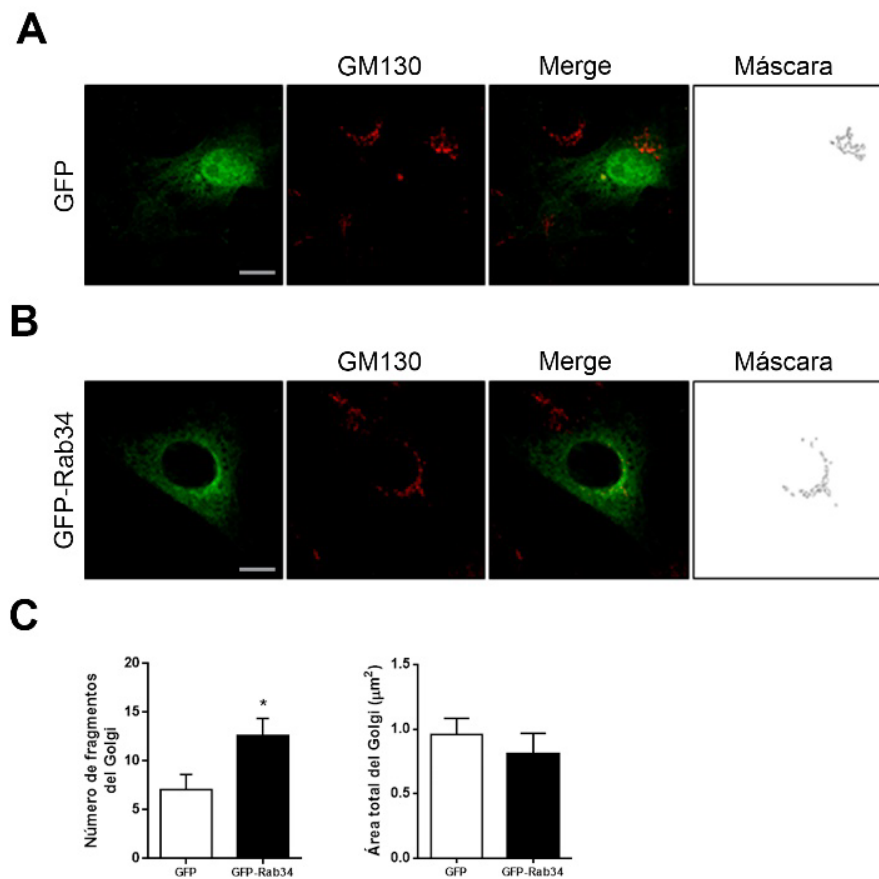
a día 6 de diferenciación con los vectores correspondientes y, tras 48 h, se inmunotifieron con el anticuerpo anti-PLIN y se observaron al microscopio confocal (Fig. 31). Como muestran la micrografías de la Figura 33, tanto GFP-Rab34 como GFP-Rab34Q111L se distribuyeron en posición yuxtannuclear (i.e., aparato de Golgi) así como entorno a la gotas lipídicas que comienzan a acumularse a día 3 (Fig. 32A) y que aparecen con asiduidad en etapas de diferenciación más tardías (día 6 en adelante; Figs. 32 B y C). Además de estas localizaciones, se observó un marcaje fluorescente perinuclear para ambas proteínas, el cual es reminiscente de las membranas túbulo-vesiculares del retículo endoplásmico (Fig. 32).



**Figura 32.** Estudio de la distribución de Rab34 en sobreexpresión. Imágenes representativas de microscopía confocal de células 3T3-L1 (A) a día 3 de diferenciación transfectadas con el vector GFP-Rab34 o (B y C) a día 6 de diferenciación electroporadas con (B) el vector GFP-Rab34 o (C) su mutante activo GFP-Rab34 Q111L, e inmunoteñidas con PLIN. Barra de escala, 10 μm.

### **4.2.3. Efecto de la sobreexpresión de Rab34 sobre la organización estructural del aparato de Golgi**

La localización de Rab34 en asociación al aparato de Golgi nos llevó a investigar si esta GTPasa, podría ejercer una función estructural en dicho orgánulo, al igual que ocurre con otras proteínas Rab (Liu y Storrie, 2015). Para ello, analizamos el efecto de la sobreexpresión de Rab34 sobre el aparato de Golgi a días tempranos de diferenciación, cuando la proteína endógena localiza preferentemente en este orgánulo. Así, células 3T3-L1 a día 3 de diferenciación fueron transfectadas con el vector de expresión GFP-Rab34 o con el vector GFP como control y, 48 h más tarde, fueron fijadas e inmunoteñidas con anti-GM130 y analizadas por microscopía confocal. En las imágenes de la Figura 34 se muestra la estructura del aparato de Golgi en células que sobreexpresan GFP (Fig. 33A) o GFP-Rab34 (Fig. 33B), lo que se puede observar con mayor detalle en la máscara de la señal fluorescente correspondiente a GM130 obtenida mediante ImageJ. En concreto, la sobreexpresión de GFP-Rab34 provocó un aumento significativo en el número de fragmentos de este orgánulo sin afectar a su área total (Fig. 33C). Estos resultados sugieren que Rab34 podría participar en la formación de vesículas derivadas del aparato de Golgi, lo que está apoyado por su relación espacial con componentes del complejo Arf1/COPI.



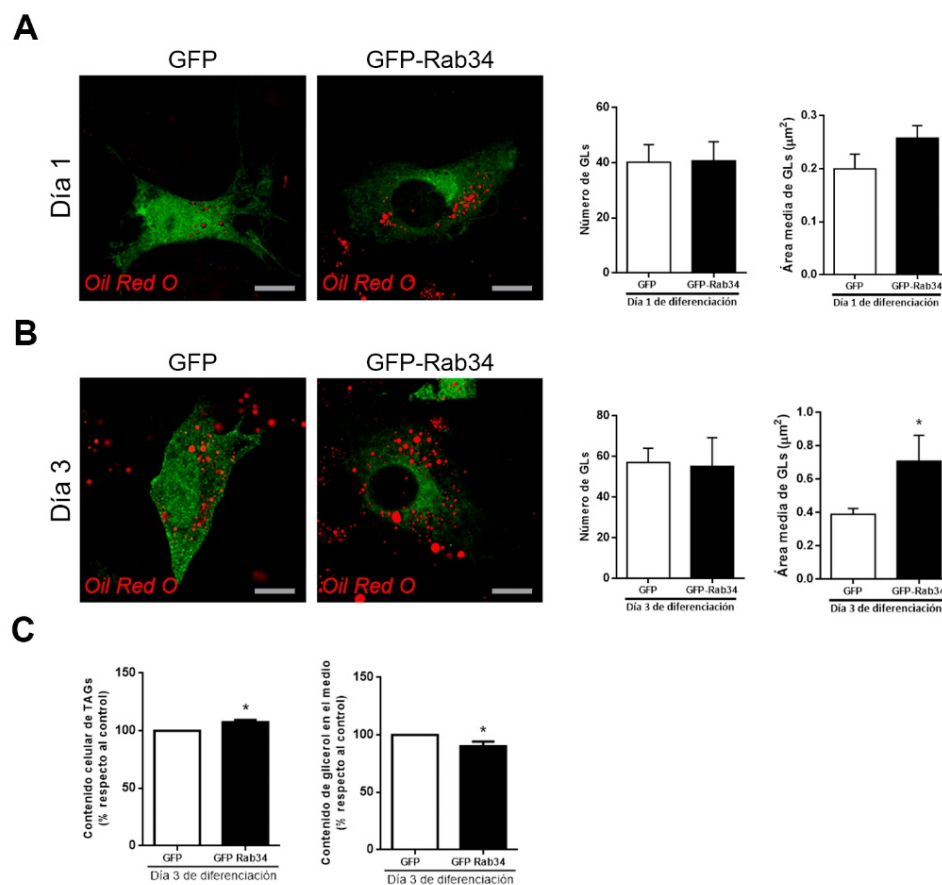
**Figura 33.** Análisis del efecto de la sobreexpresión de Rab34 sobre la estructura del aparato de Golgi. Células 3T3-L1 fueron transfectadas con los vectores GFP y GFP-Rab34 e inmunoteñidas con anti-GM130 (rojo). (A) Imágenes representativas de microscopía confocal que muestran el área total del aparato de Golgi en cada condición analizada (panel de la derecha, máscara). Barra de escala, 10  $\mu\text{m}$ . (B) Cuantificación del área del Golgi por condición, unidades expresadas en  $\mu\text{m}^2$ . (C) Cuantificación del número de fragmentos de Golgi. Las mediciones expresan la media  $\pm$ SEM de al menos 10 células por condición \* $P < 0,05$  vs. células transfectadas con GFP.

#### 4.2.4. Efecto de la sobreexpresión de Rab34 sobre el proceso de adipogénesis

Para evaluar si Rab34 está involucrada en la formación de GLs durante el proceso de diferenciación adipocitaria se llevaron a cabo varios estudios independientes pero complementarios entre sí. El primero de ellos fue examinar el efecto de la sobreexpresión de Rab34 sobre el número y tamaño de las GLs, utilizando la sobreexpresión de GFP-Rab34 a distintos días de diferenciación (día 1 y día 3). Transcurridas 48 h, las células se procesaron para teñir los lípidos neutros contenidos en las GLs mediante la técnica de *Oil Red O*. La cuantificación del área media de GLs y el número de GLs por célula mostró que la sobreexpresión de Rab34 provocó un

aumento del tamaño de estos orgánulos sin afectar su número desde días tempranos de diferenciación (día 1), efecto que se acentuó a días más tardíos (día 3) (Fig. 34 A y B).

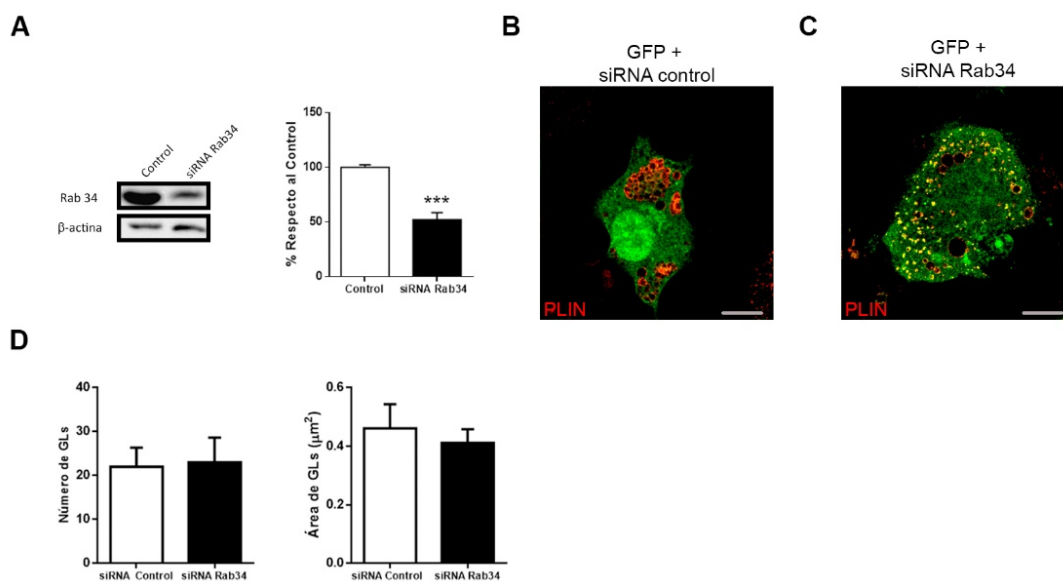
De forma paralela, se evaluaron las tasas de lipogénesis (contenido de triglicéridos) y lipólisis basal (glicerol en medio) en células que sobreexpresaban Rab34 a día 3 de diferenciación. Como muestra la Figura 34C, la sobreexpresión de la GTPasa provocó un ligero aumento, aunque significativo, en el contenido celular de triglicéridos y disminuyó de manera concomitante la liberación de glicerol al medio. En conjunto, estos resultados apuntan a que Rab34 juega un papel importante en la adipogénesis, por una parte ayudando a la carga de las GLs y, por tanto a su crecimiento, mediante la estimulación de la lipogénesis y, por otra, impidiendo la hidrólisis de triglicéridos gracias a la inhibición de la lipólisis.



**Figura 34.** Análisis del efecto de la sobreexpresión de Rab34 en la adipogénesis. Células 3T3-L1 sobreexpresando GFP o GFP-Rab34 a (A) día 1 o (B) día 3 de diferenciación y teñidas con *Oil Red O*. Cuantificación del número de GLs y área de las mismas GLs (en  $\mu\text{m}^2$ ) por cada día de diferenciación. Barra de escala, 10  $\mu\text{m}$ . (C) Medición del contenido de triglicéridos (lipogénesis) y liberación de glicerol (lipólisis) en células 3T3-L1 a día 3 de diferenciación. Los datos corresponden a las medias  $\pm$ SEM de al menos tres réplicas. \* $P < 0,05$  vs. células transfectadas con GFP.

#### 4.2.4.1. Efecto del silenciamiento de Rab34 sobre el proceso de adipogénesis

Basándonos en resultados anteriores que mostraban que la sobreexpresión de GFP-Rab34 solo afecta significativamente en el área media de las GLs a día 3 de diferenciación, realizamos un análisis del silenciamiento de esta GTPasa en este punto de la diferenciación de células 3T3-L1. Para ello las células fueron co-transfectadas utilizando el vector GFP como control de trasfección en combinación con el siRNA Rab34 o el siRNA control. Transcurridas 72 h las células fueron procesadas para inmunobloting (Fig. 35A) o para inmunotinción, utilizando el anticuerpo anti-PLIN para marcar las gotas lipídicas (Fig. 35 B y C). El análisis de *Western blot* mostró que usando el siRNA elegido se obtuvo una disminución de la expresión de Rab34 de hasta el 54% (Fig. 35A). El silenciamiento de Rab34 no provocó cambio alguno en el número de GLs o el área media de las mismas (Fig. 35D).



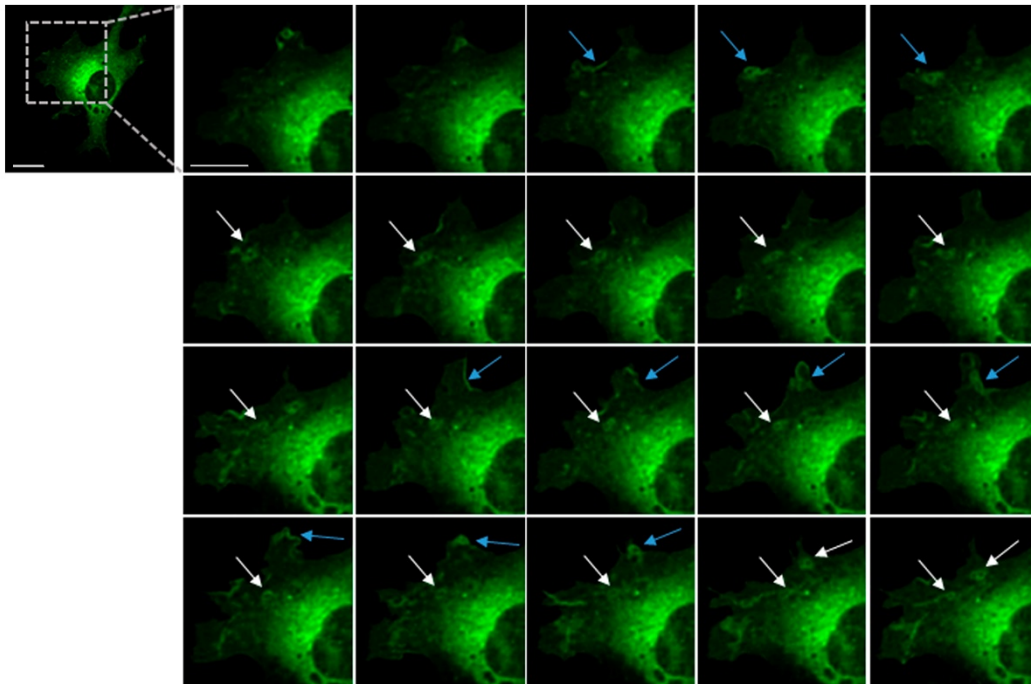
**Figura 35.** Análisis del efecto del silenciamiento de Rab34 en la adipogénesis. (A) *Western blot* del silenciamiento de Rab34 y cuantificación de la señal de Rab34. Los datos son expresados como la media  $\pm$  SEM de 4 experimentos independientes. \*\*\* $P < 0,001$  vs. células transfectadas con siRNA control. Células 3T3-L1 co-transfectadas con el vector de expresión GFP junto con (B) el siRNA control o (C) el siRNA Rab34 a día 3 de diferenciación e inmunoteñidas con PLIN1. (D) Cuantificación del número de GLs y área media de las mismas GLs (en  $\mu\text{m}^2$ ). Barra de escala, 10  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2.4.2. Monitorización de la dinámica intracelular de Rab34 mediante videomicroscopía

Para profundizar en la función de Rab34 en relación al metabolismo lipídico en adipocitos monitorizamos la distribución de la proteína exógena GFP-Rab34 a lo largo del tiempo en adipocitos 3T3-L1 estimulados con insulina en condiciones de sobrecarga de ácidos grasos. Concretamente, transfectamos las células a día 3 de diferenciación y, transcurridas 48 h, se expusieron a oleato 250  $\mu$ M durante 24 h para fomentar la formación de gotas lipídicas. En las últimas 4 h de tratamiento, se añadió al medio de cultivo insulina (100 nM) para poder examinar el comportamiento de Rab34 en relación a la dinámica de incorporación de ácidos grasos en los adipocitos.

Durante el tiempo de registro (mínimo de 110 min a intervalos de 1 min) se observó una acumulación de Rab34 en la superficie celular en estructuras de membrana remeniscentes de lamelipodios (Fig. 36, flechas azules), que rápidamente invaginaban (entre 4 y 8 min), dando lugar a estructuras de perfil esférico recubiertas de GFP-Rab34 (Fig. 36, flechas blancas). Estas estructuras vesiculares iniciaban un transporte retrógrado a medida que sufrían un aumento de tamaño, hasta alcanzar la red túbulo-vesicular de membranas del retículo endoplásmico entorno al núcleo celular. A raíz de estos resultados, sería razonable proponer que Rab34 podría participar de manera activa en la organización de las estructuras de membrana que median la captación de ácidos grasos y su transporte hacia el centro celular encargado de la esterificación de los mismos, el retículo endoplásmico (Nagayama *et al.*, 2007).

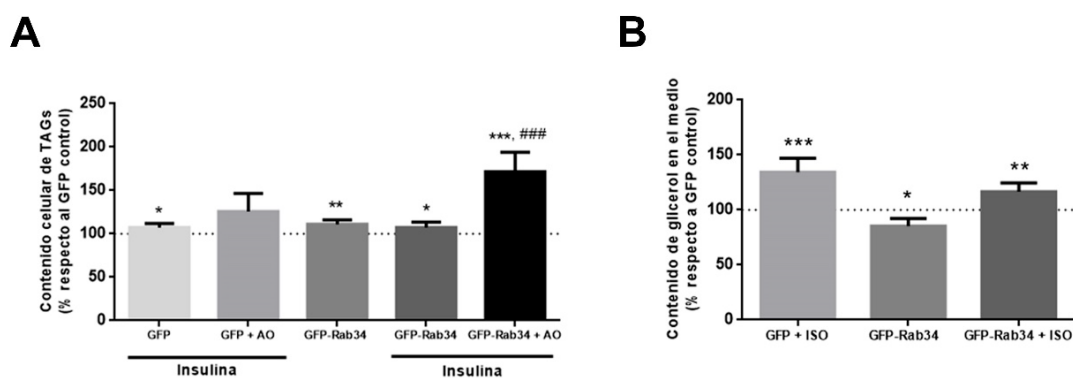




**Figura 36.** Videomicroscopía en tiempo real en células 3T3-L1 transfectadas con GFP-Rab34 a día 3 de diferenciación y monitorizadas tras estímulo con ácido oleico 250  $\mu$ M e insulina 100 nM. Barra de escala, 10  $\mu$ m.

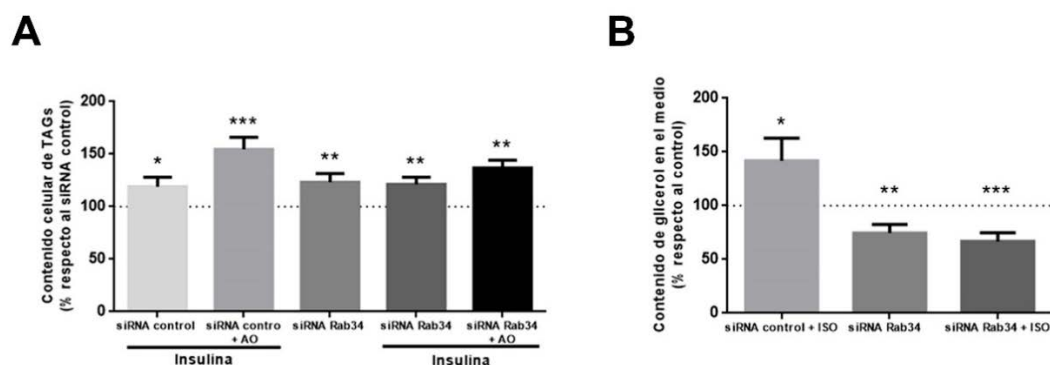
#### 4.2.4.3. Efecto de Rab34 en etapas avanzadas de la diferenciación de los adipocitos

En el presente estudio también se llevó a cabo la evaluación del efecto de Rab34 en la capacidad de gestión de lípidos de células 3T3-L1 con un grado avanzado de diferenciación adipocitaria. Para ello, se realizaron experimentos de sobreexpresión y de silenciamiento de Rab34 en células a día 6 de diferenciación, que presentan un número considerable de GLs, en condiciones basales, tras la estimulación de la lipogénesis (insulina 100 nM) o la lipólisis (isoproterenol 10  $\mu$ M) y bajo condiciones de sobrecarga de ácidos grasos (ácido oléico 250  $\mu$ M). Concretamente, la sobreexpresión de Rab34 produjo un aumento de la tasa de lipogénesis basal sin alterar el efecto de la insulina en este proceso (Fig. 37A). Sin embargo, en aquellas células que sobreexpresan Rab34 y expuestas a insulina en presencia de ácido oleico, la tasa de lipogénesis aumentó significativamente con respecto a la que presentan las células control (Fig. 37A). Por su parte, la sobreexpresión de Rab34 indujo de forma paralela una disminución significativa de la actividad lipolítica basal y estimulada por isoproterenol, si bien esta última no alcanzó significancia estadística (Fig. 37B).



**Figura 37.** Efecto de la sobreexpresión de GFP-Rab34 en la actividad lipogénica y lipolítica de adipocitos. Se evaluó (A) el contenido intracelular de triglicéridos (TAG) y (B) la cantidad de glicerol liberado al medio en adipocitos 3T3-L1 sobreexpresando GFP o GFP-Rab34. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  vs. GFP control (línea punteada); ### $P < 0,001$  vs. GFP-Rab34. Los datos están expresados como la media  $\pm$  SEM de al menos  $n = 6$  réplicas biológicas.

Asimismo, se analizó el impacto del silenciamiento de Rab34 en las actividades lipogénica y lipolítica de adipocitos 3T3-L1. Así, en células con expresión de Rab34 reducida hasta un 54% (ver apartado 4.2.4.1), ni la actividad lipogénica basal ni la estimulada por insulina se vieron alteradas. Igualmente, tampoco se varió esta actividad en células tratadas con insulina en presencia de alta concentración de ácido oléico en el medio (Fig. 38A). En cambio, el silenciamiento de la GTPasa sí afectó las actividades lipolítica basal y estimulada. En concreto, la reducción de la expresión de Rab34 en estas células redujo significativamente la lipólisis basal y bloqueó completamente el efecto estimulador del isoproterenol (Fig. 38B).

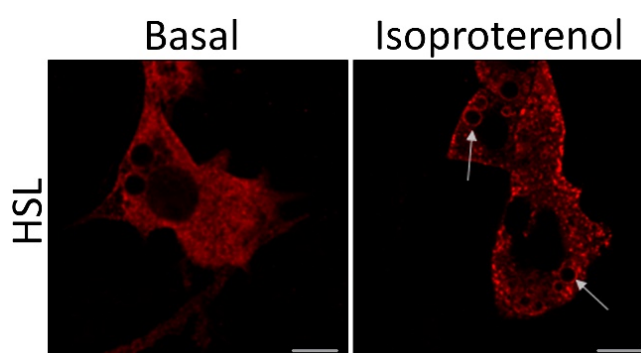


**Figura 38.** Efecto del silenciamiento de la proteína Rab34 en la actividad lipogénica y lipolítica de adipocitos 3T3-L1. Se evaluó (A) el contenido intracelular de triglicéridos (TAG) y (B) la cantidad de glicerol liberado al medio en adipocitos 3T3-L1 electroporados con siRNA control o siRNA Rab34. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  vs. siRNA control (línea punteada). Los datos están expresados como la media  $\pm$  SEM de al menos  $n = 6$  réplicas biológicas.

### 4.3. Estudio de sobreexpresión de Rab34

#### 4.3.1. Estudio de la sobreexpresión de Rab34 sobre marcadores del metabolismo lipídico en adipocitos

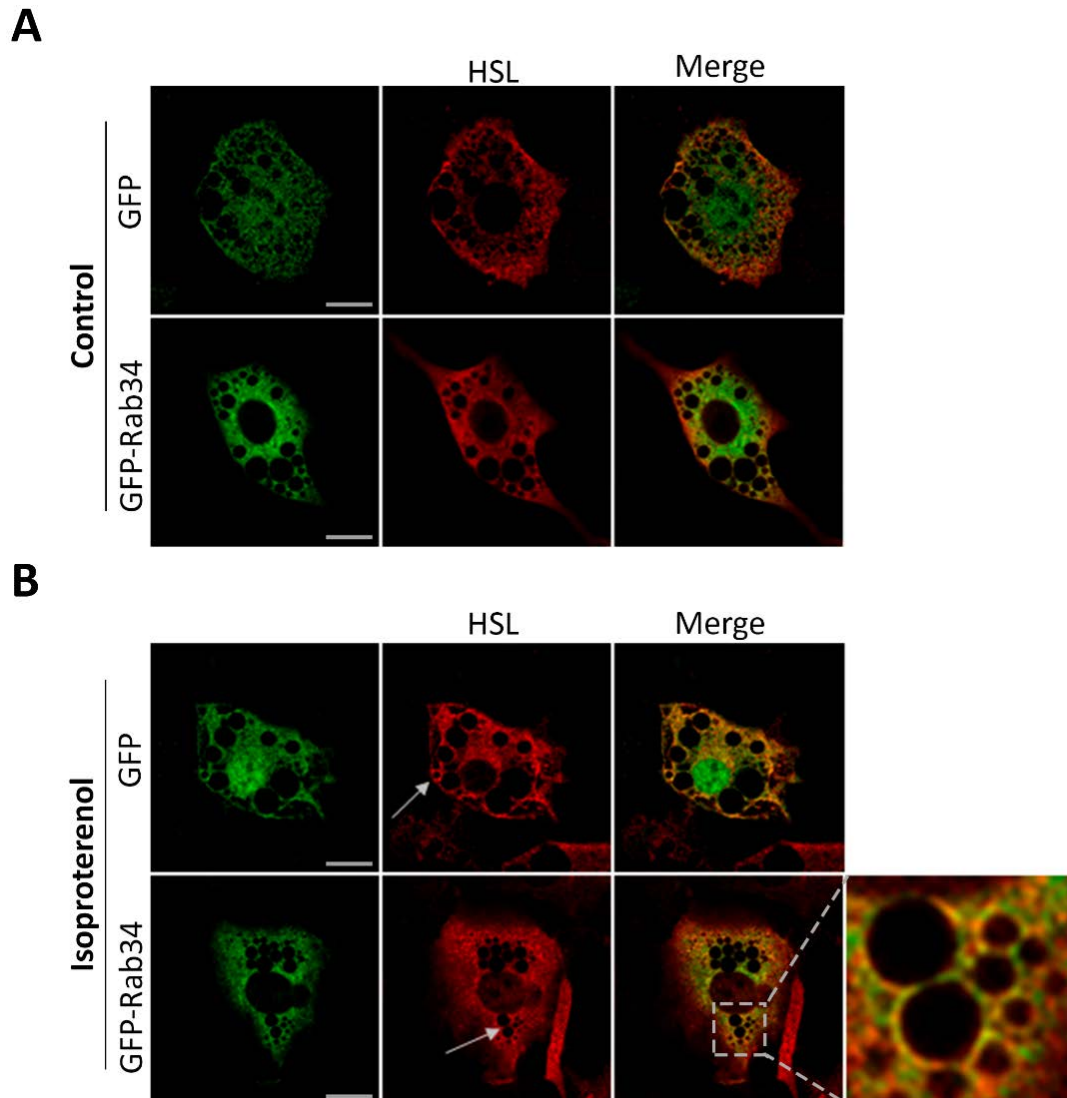
Los datos de sobreexpresión de Rab34 mostraban un efecto inhibitorio en la tasa lipolítica basal de adipocitos así como en la estimulada por isoproterenol, acompañado de un aumento modesto del contenido de triglicéridos que podría ser consecuencia de una disminución en su hidrólisis (ver apartado 4.2.4.) En este sentido, procedimos a continuación a analizar la relación espacial y funcional de Rab34 con la proteína que cataliza la reacción enzimática limitante de la lipólisis, la lipasa sensible a hormonas (HSL). Para ello, en primer lugar caracterizamos la localización intracelular de HSL en adipocitos 3T3-L1 en condiciones basales y tras la estimulación de la lipólisis con isoproterenol y, al igual que otros autores mostraron previamente (McDonough *et al.*, 2011), observamos una migración de HSL desde una localización citosólica difusa en células no estimuladas a estar claramente asociada con la superficie de las GLs tras la estimulación lipolítica (Fig. 39).



**Figura 39.** Análisis de la localización de la lipasa sensible a hormonas, HSL, en células 3T3-L1 a día 5 de diferenciación en condiciones basales y tras estímulo con isoproterenol. Barra de escala, 10  $\mu\text{m}$ .

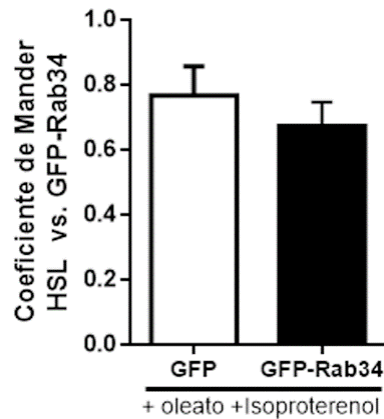
Una vez confirmada la dinámica de la proteína HSL tras el tratamiento con isoproterenol, investigamos el efecto de la sobreexpresión de Rab34 sobre dicha dinámica (Fig. 40). Para ello, células 3T3-L1 a día 3 de diferenciación fueron transfectadas con el vector GFP vacío, como control, y con el vector de expresión GFP-Rab34. Así, en células en condiciones basales (Fig. 40, panel superior), HSL poseía

una distribución citosólica, mientras que en aquellas expuestas a isoproterenol HSL se redistribuía en la superficie de las GLs, donde colocalizó con Rab34. (Fig. 40, panel inferior).



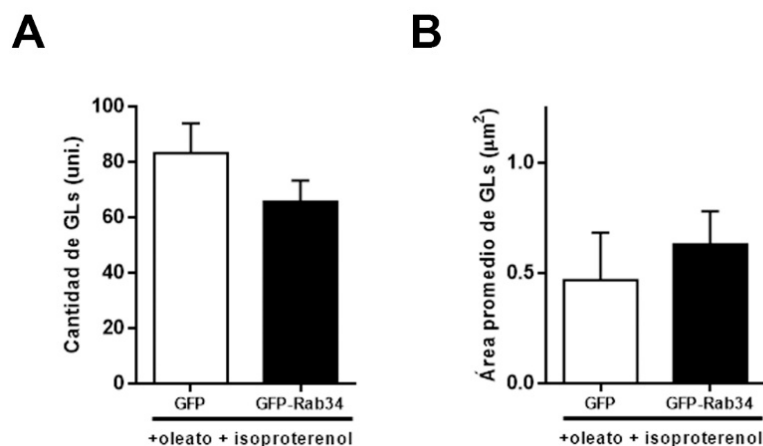
**Figura 40.** Imágenes de microscopía confocal de células 3T3-L1 a día 5 de cultivo que sobreexpresan GFP o GFP-Rab34 (verde) e inmunomarcadas para HSL (rojo), en condiciones (A) control y (B) bajo tratamiento con isoproterenol 10  $\mu$ M. Las regiones en color amarillo corresponden a las zonas de colocalización de ambas señales. Barra de escala, 10  $\mu$ m.

Además, estudiamos el efecto de la sobreexpresión de Rab34 sobre la translocación de HSL a las GLs en respuesta al estímulo lipolítico (Fig. 41). Así, observamos que la sobreexpresión de Rab34 induce una disminución moderada del grado de colocalización con HSL en la superficie de las GLs, lo que sugiere una disminución de la cantidad de HSL asociada a las GLs.



**Figura 41.** Estudio de cuantificación de la colocalización de HSL con GFP o GFP-Rab34 en células 3T3-L1, transfectadas a día 3, tratadas con oleato 250  $\mu\text{M}$  durante 18 h y expuestas a isoproterenol 10  $\mu\text{M}$  durante 4 h. El coeficiente de Manders está expresado en unidades arbitrarias (u.a.).

Para determinar el efecto de Rab34 en la formación de GLs, se cuantificó el número de estos orgánulos y el área promedio de las mismas en células sobreexpresando GFP o GFP-Rab34 tratadas con oleato (para inducir la formación de GLs) y tratadas con isoproterenol. En dichas células se observó que el número de GLs en respuesta a isoproterenol tiende a ser menor (Fig. 42A) en condiciones de sobreexpresión de Rab34, mientras que el área promedio de las GLs mostró una tendencia a aumentar en estas células (Fig. 42B), aunque ninguna de estas diferencias alcanzó significancia estadística. Estos resultados apoyarían una función de Rab34 como protector frente al efecto lipolítico del isoproterenol.

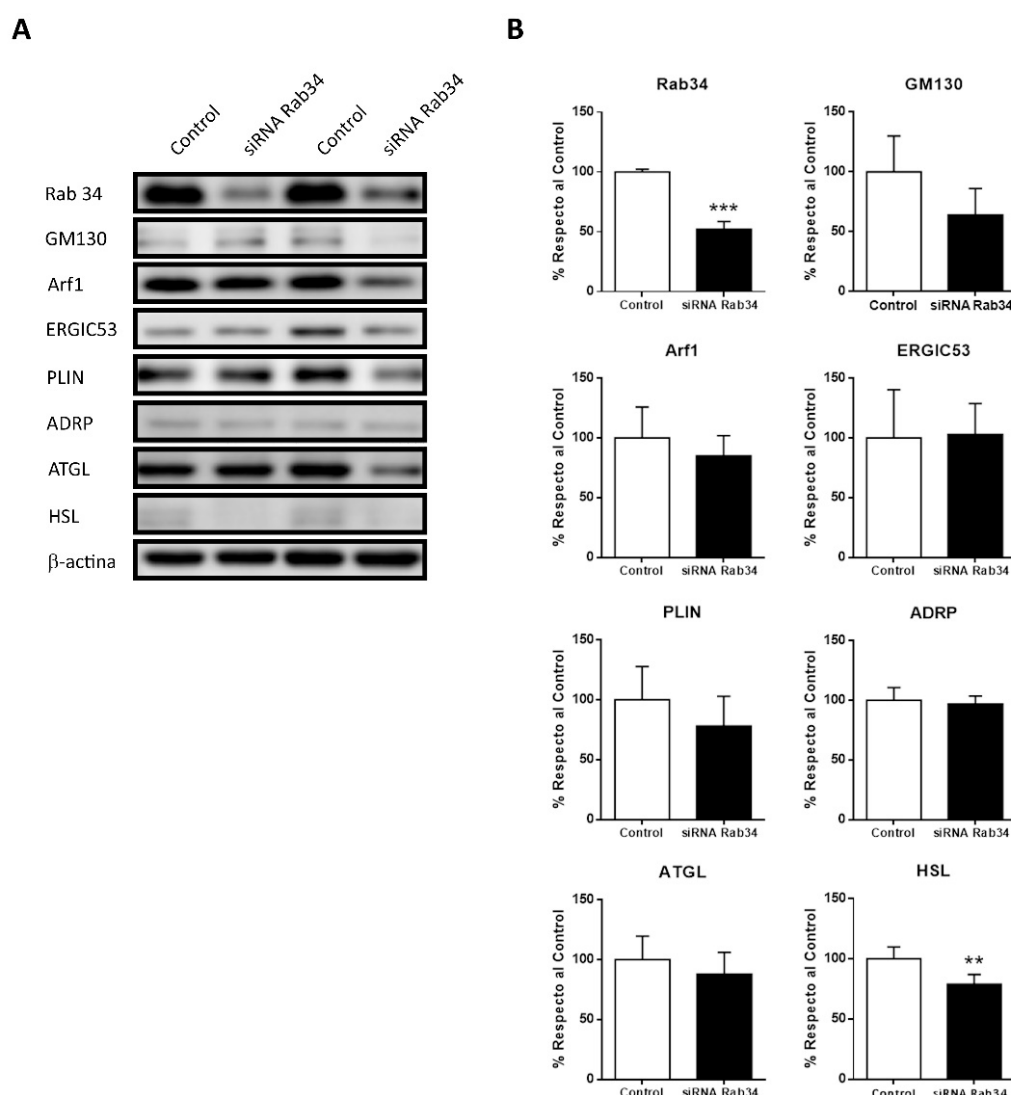


**Figura 42.** Estudio de GLs en células 3T3-L1 sobreexpresando GFP o GFP-Rab34, tratadas 18 horas con oleato 250  $\mu\text{M}$  en respuesta a tratamiento con isoproterenol 10  $\mu\text{M}$  durante 4 horas. (A) Cuantificación de la cantidad de GLs expresada en unidades. (B) Área promedio de GLs expresada en  $\mu\text{m}^2$ .

#### **4.4. Efecto del silenciamiento de Rab34 en células 3T3-L1**

Para estudiar el efecto del silenciamiento de Rab34 en células 3T3-L1, preadipocitos 3T3-L1 fueron transfectados con los siRNAs control o Rab34 25 nM a día 3 de diferenciación, de las cuales se extrajeron extractos proteicos 72 horas posteriores a la transfección. Adicionalmente, también se estudió el efecto del silenciamiento de Rab34 sobre la expresión de otras proteínas relacionadas con el aparato de Golgi, como GM130, con el tráfico intracelular de membranas como Arf1 y ERGIC53, y relacionadas con la funcionalidad de las GLs, como PLIN1, la lipasa de triglicéridos del tejido adiposo, ATGL y la lipasa sensible a hormonas, HSL (Fig. 43A).

La cuantificación del análisis de Western blot reveló que el silenciamiento de Rab34 induce una disminución significativa de la expresión de HSL ( $P < 0.01$ ) (Fig. 43B) sin afectar significativamente la expresión de los otros genes estudiados.



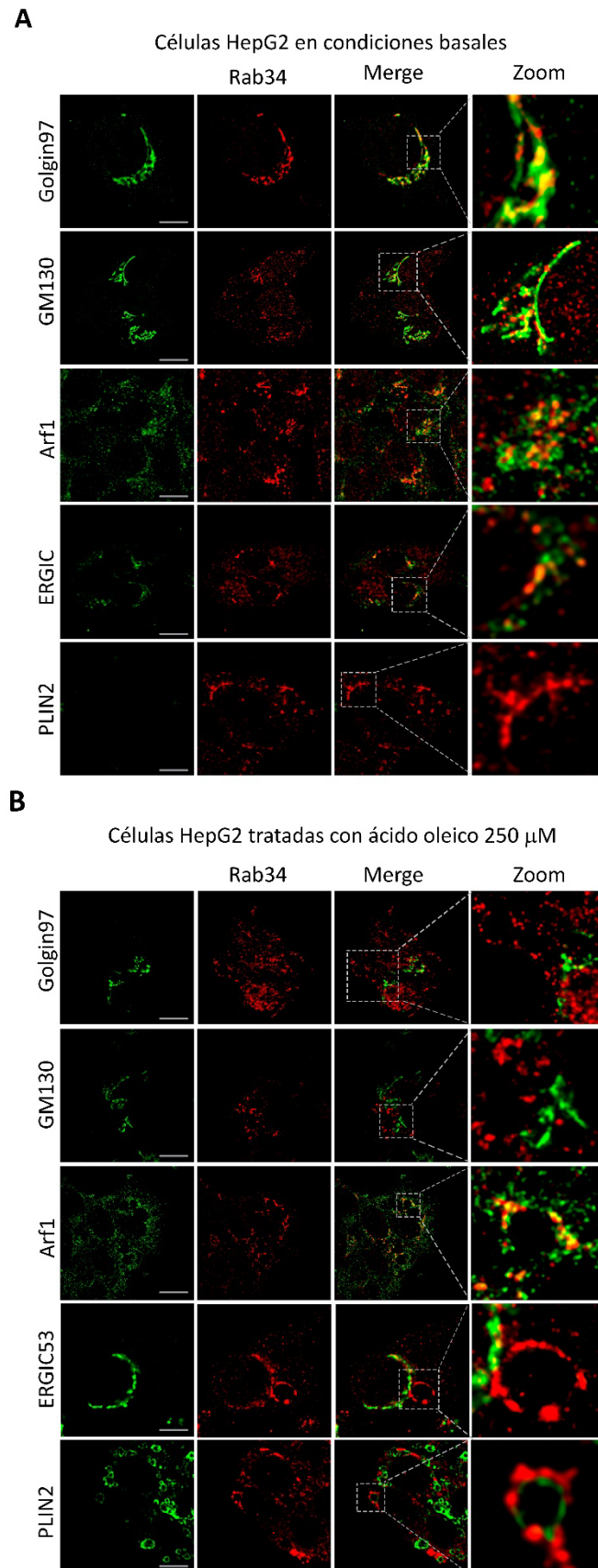
**Figura 43.** Efecto del silenciamiento de Rab34 en la expresión de proteínas clave del aparato de Golgi y las GLs. (B) Western blot de dos muestras representativas y (C) cuantificación del efecto del silenciamiento de Rab34 sobre proteínas clave del aparato de Golgi (GM130 y Arf1), del compartimento ERGIC (ERGIC53) y de las GLs (PLIN, ATGL y HSL). Los datos están expresados como la media  $\pm$  SEM de  $n = 6$  réplicas biológica.  $**P < 0,01$ ;  $***P < 0,001$  vs. células control.

#### 4.5. Estudio de la distribución de Rab34 en la línea celular de hepatocarcinoma HepG2

Rab34 también fue estudiado en otro tipo celular, los hepatocitos, que, aunque en condiciones normales no presenta gotas lipídicas, son una de las principales dianas de la acumulación ectópica de ácidos grasos en condiciones patológicas (Lara-Castro y Garvet, 2008). Para realizar este estudio se utilizó la línea celular de hepatocarcinoma humano HepG2. El estudio de doble inmunocitoquímica

y microscopía confocal reveló que, al igual que ocurre en adipocitos, Rab34 localiza en membranas del aparato de Golgi, donde colocaliza fuertemente con los marcadores de las redes *trans*- y *cis*-Golgi (Golgin97 y GM130, respectivamente), así como con el marcador de vesículas de transporte retrógrado Arf1/COPI derivadas de éste (Arf1) (Fig. 44A). Sin embargo, cuando se indujo la formación de gotas lipídicas en los hepatocitos sometiendo a las células a una sobrecarga de ácidos grasos (oleato 250  $\mu$ M durante 18 h), se observó que Rab34 pierde su característica asociación con membranas del aparato de Golgi, pero aumenta substancialmente su interacción con la superficie de las GLs de nueva formación. Así, tras el tratamiento, Rab34 colocaliza significativamente con el marcador de GLs específico de hepatocitos PLIN2 (Straub *et al.*, 2008) y con el *pool* de Arf1 que se ha demostrado previamente estar asociado a estos orgánulos (Wilfling *et al.*, 2014) (Fig. 44B). Asimismo, cabe destacar que Rab34 también apareció en membranas ERGIC colocalizando con el marcador específico de este compartimento ERGIC53 tanto en condiciones basales como tras la estimulación de las células con oleato (Fig.44 A y B).



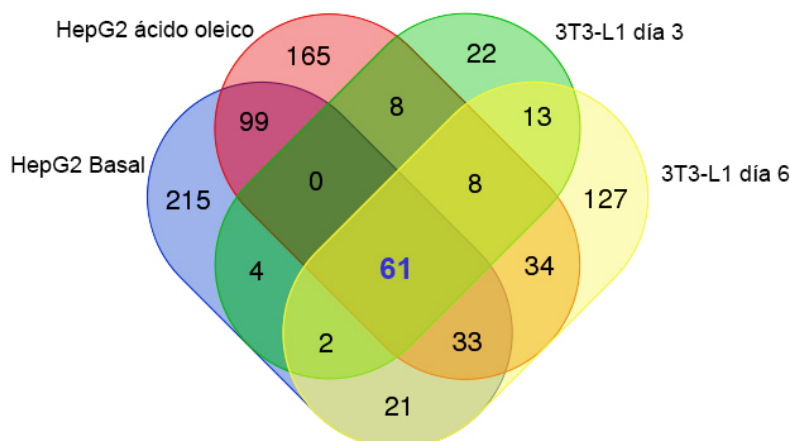


**Figura 44.** Distribución intracelular de Rab34 en células HepG2 (A) en condiciones basales y (B) tras tratamiento 18 h con ácido oleico 250  $\mu$ M. Rab 34 sufre un cambio de localización, de una distribución

relacionada al Golgi en condiciones basales a una más vesiculo-reticular y alrededor de las GLs bajo tratamientos de ácido oleico. Barra de escala, 10  $\mu\text{m}$ .

#### **4.5.1. Aislamiento e identificación de proteínas interactoras de Rab34 relacionadas con los procesos de lipogénesis y tráfico intracelular de membranas**

Para profundizar sobre las bases moleculares que subyacen en la función de Rab34 en adipocitos empleamos la técnica BioID (Roux *et al.*, 2012) combinada con espectrometría de masas (nano-LC acoplado a un híbrido-cuadropolo-TOF 5600+) con el fin de aislar e identificar las proteínas asociadas físicamente o formando complejo con la GTPasa. Para ello, se diseñó y construyó un vector de expresión GFP-Rab34 unido a una proteína ligasa de biotina, BirA, lo que provocará la biotinilación de proteínas próximas a la GTPasa. Las proteínas biotiniladas fueron seleccionadas por aislamiento con *beads* magnéticas conjugadas con estreptavidina para su posterior identificación. Utilizando esta técnica, se pudieron identificar un número importante de proteínas asociadas a Rab34 o formando complejo con la GTPasa en células 3T3-L1 y HepG2. En concreto, se identificaron más de 1500 proteínas que, tras un primer filtro en el que se descartaron proteínas ribosomales, relacionadas con la transcripción y traducción, nucleares y las consideradas contaminantes (i.e. keratinas), se obtuvieron un total de 118 proteínas en preadipocitos 3T3-L1 (día 3 de diferenciación) y 299 en adipocitos, 435 en células HepG2 en condiciones basales y 408 en HepG2 tratadas con oleato. Tras esta primera inspección de las identificaciones se obtuvieron un total de 61 proteínas comunes en todas las condiciones estudiadas (Fig. 45).



**Figura 45.** Diagrama representando el número de proteínas identificadas en cada una de las condiciones experimentales y las comunes en cada posible combinación de condiciones. En azul se representa el número de proteínas identificadas en todas las condiciones investigadas. El diagrama de Venn fue generado utilizando la aplicación informática de *Bioinformatics Evolutionary Genomics* (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/software/details/Venn-Diagrams>)

Entre las proteínas identificadas se encontraron, proteínas que actúan secuencialmente en la ruta de síntesis de ácidos grasos, en la lipogénesis *de novo*, estas proteínas son: ATP citrato liasa (ACLY), acetil-CoA carboxilasa (ACC), y ácidos grasos sintetasa (FASN). Adicionalmente, esta técnica nos permitió identificar varias proteínas relacionadas con el tráfico celular (Arf1, Arf6, COPA, CLTC, etc.), componentes del citoesqueleto (ACTA, miosinas, plectina, vimentina, etc.), otras proteínas Rab (Rab1A, Rab11, Rab18, Rab7, etc.). La Tabla 7 muestra una relación de las proteínas comunes identificadas en todas las condiciones experimentales y tipos celulares utilizados para el estudio, clasificadas de acuerdo a su función o localización intracelular.

**Tabla 7.** Proteínas identificadas en el interactoma de Rab34 en adipocitos 3T3-L1 a día 3 y 6 de diferenciación y hepatocitos HepG2 en condiciones basales y tras su exposición a 250  $\mu$ M de ácido oleico. Se representan las proteínas que son comunes en las cuatro condiciones estudiadas.

LOCALIZACIÓN / FUNCIÓN	SÍMBOLO	NOMBRE DE LA PROTEÍNA
SÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS	ACLY	ATP citrato liasa
	ACC	Acetil-CoA carboxilasa
	FASN	Sintasa de ácidos grasos
COMPLEJO DEL ANILLO TCP1	CCT2	Chaperonina que contiene subunidad 2 de TCP1
	CCT3	Chaperonina que contiene subunidad 3 de TCP1
	CCT4	Chaperonina que contiene subunidad 4 de TCP1
	CCT5	Chaperonina que contiene subunidad 5 de TCP1

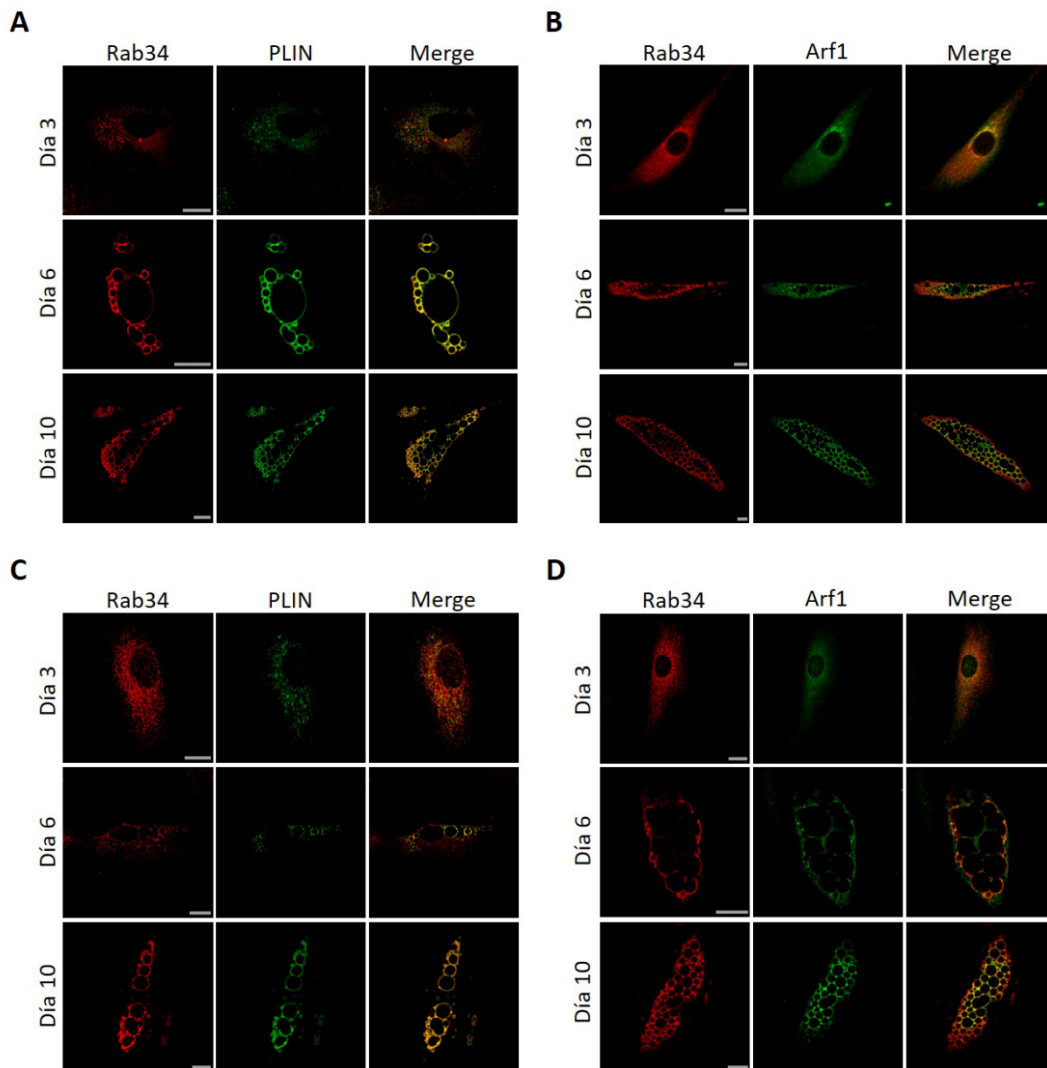
	CCT7	Chaperonina que contiene subunidad 7 de TCP1
	CCT8	Chaperonina que contiene subunidad 8 de TCP1
	TCP1	Proteína 1 del complejo T
<b>CITOESQUELETO</b>	ACTA1	Actina subunidad A1
	ACTB	Actina subunidad B
	ACTG1	Actina sugunidad G1
	ACTN1	Alfa-Actina-1
	CFL1	Cofilin1
	DYNC1H1	Cadena pesada 1 de dineina citoplasmática
	FN1	Fibronectin 1
	MYH10	Miosina 10
	MYH9	Miosina 9
	MYO1B	Miosina variante 1B
	MYO1C	Miosina variante 1C
	MYO5C	Miosina variante 5c
	PFN1	Profilina 1
	PLEC	Plectina
	TUBA1B	Tubulina alfa 1B
	TUBB	Tubulina beta
	TUBB2C	Tubulina beta 2C
TUBB6	Tubulina beta 6	
VIME	Vimentina	
<b>PROTEÍNAS RAB</b>	RAB11	Rab11
	RAB14	Rab14
	RAB18	Rab18
	RAB1A	Rab1A
	RAB2	Rab2
	RAB21	Rab21
	Rab34	Rab34
	RAB5C	Rab5C
	RAB7	Rab7
<b>TRÁFICO CELULAR</b>	AGAP1	Arf-GAP con GTPasa 1
	AP3D1	Complejo AP-3 unidad delta-1
	ARF1	Factor 1 ADP de ribosilación
	ARF3	Factor 3 ADP de ribosilación
	ARF4	Factor 4 ADP de ribosilación
	ARF5	Factor 5 ADP de ribosilación
	ARF6	Factor 6 ADP de ribosilación
	ARHGAP10	Proteína 10 Rho activadora de GTPasa
	ARL1	Pproteína similar al factor 1 ADP de ribosilación
	CLTC	Cadena pesada de clatrina
	COPA	Subunidad alfa de coatomero

	COPB	Subunidad beta de coatomero
	COPG1	Subunidad gama 1 de coatomero
	GNB2	Subunidad beta 2 de la proteína G
	GTPBP4	Proteínas 4 de unión a GTP
	LRP1	Lipoproteína de baja densidad relacionada a receptor
	VDP	Proteína de anclaje de vesículas
RETÍCULO ENDOPLÁSMATICO	CANX	Calnexina
	BIP	Proteína de unión a inmunoglobulina
GLICÓLISIS	GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
	PGAM1	Fosfoglicerato mutasa 1
	PHGDH	Fosfoglicerato deshidrogenasa
MISCELANEA	UGDH	UDO-Glucosa 6-deshidrogenasa

En conjunto estos hallazgos sugieren que Rab34, como otras proteínas Rab, podría actuar como *scaffold* para organizar plataformas enzimáticas y/o de señalización que participen en la síntesis y acumulación de lípidos así como en el transporte intracelular de los mismos.

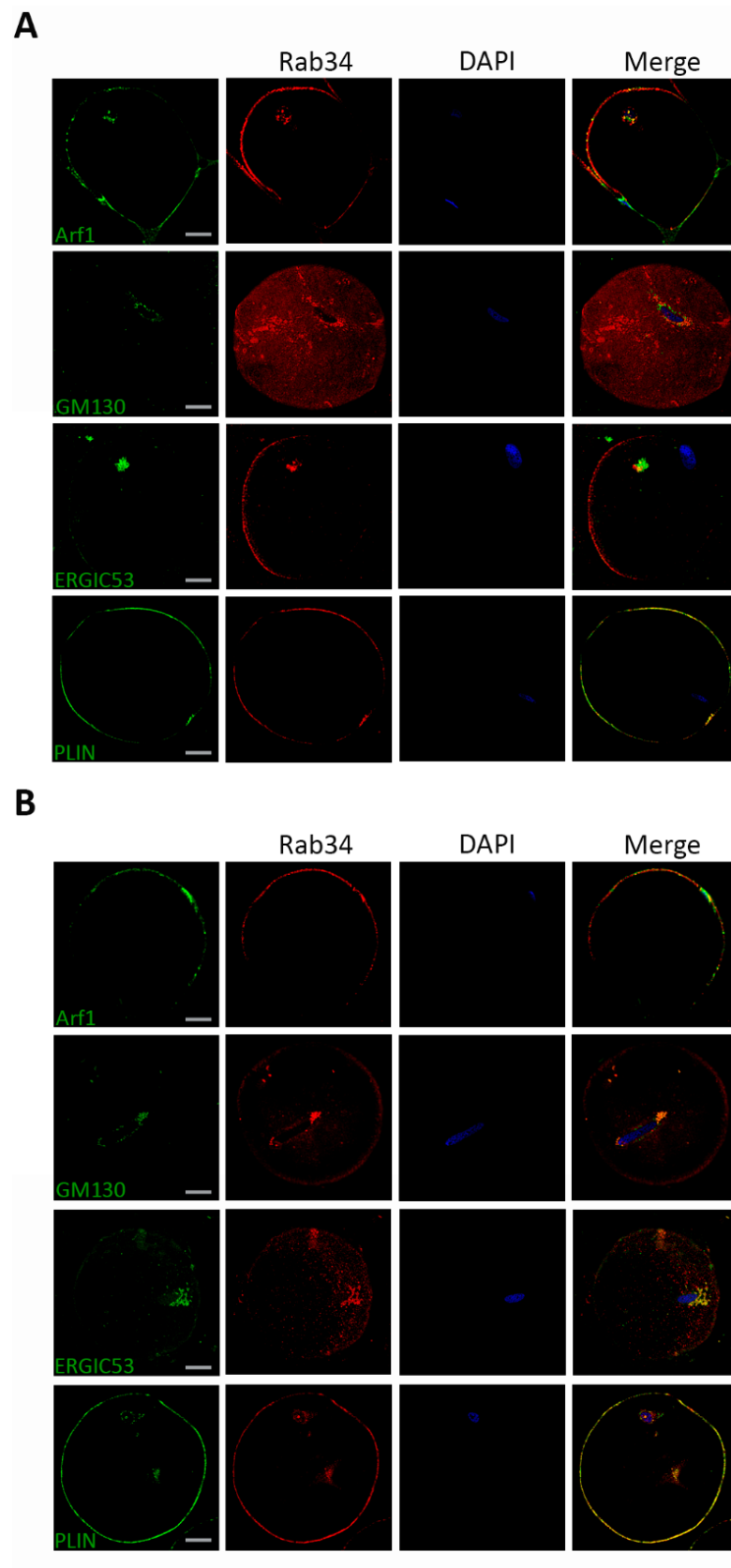
#### 4.6. Rab34 en tejido adiposo humano

La distribución de Rab34 también se estudió en preadipocitos humanos aislados de tejido adiposo omental y subcutáneo de pacientes obesos mórbidos sometidos a cirugía bariátrica. Dicho estudio reveló que en humanos Rab34 posee una distribución similar a lo observada en las células 3T3-L1 durante su diferenciación. Concretamente, a días tempranos de diferenciación (días 3) Rab34 colocalizó con Arf1, mientras que a día 6 de diferenciación, cuando las células ya presentan GLs, Rab34 se redistribuyó con Arf1 y PLIN1 en la superficie de estos orgánulos, donde se mantiene hasta días tardíos de diferenciación (día 10) (Fig. 46)



**Figura 46.** Distribución de Rab34 durante la diferenciación *in vitro* de preadipocitos humanos. Rab34 modificó su distribución durante la diferenciación de adipocitos humanos de tejido adiposo (A y B) omental y (C y D) subcutáneo. A día 3, Rab34 colocalizó con Arf1 en las membranas del aparato de Golgi, mientras que a días más avanzados (6 y 10) mostró una distribución característica en torno a las GLs, colocalizando con PLIN1 y con Arf1. Barra de escala, 10  $\mu$ m.

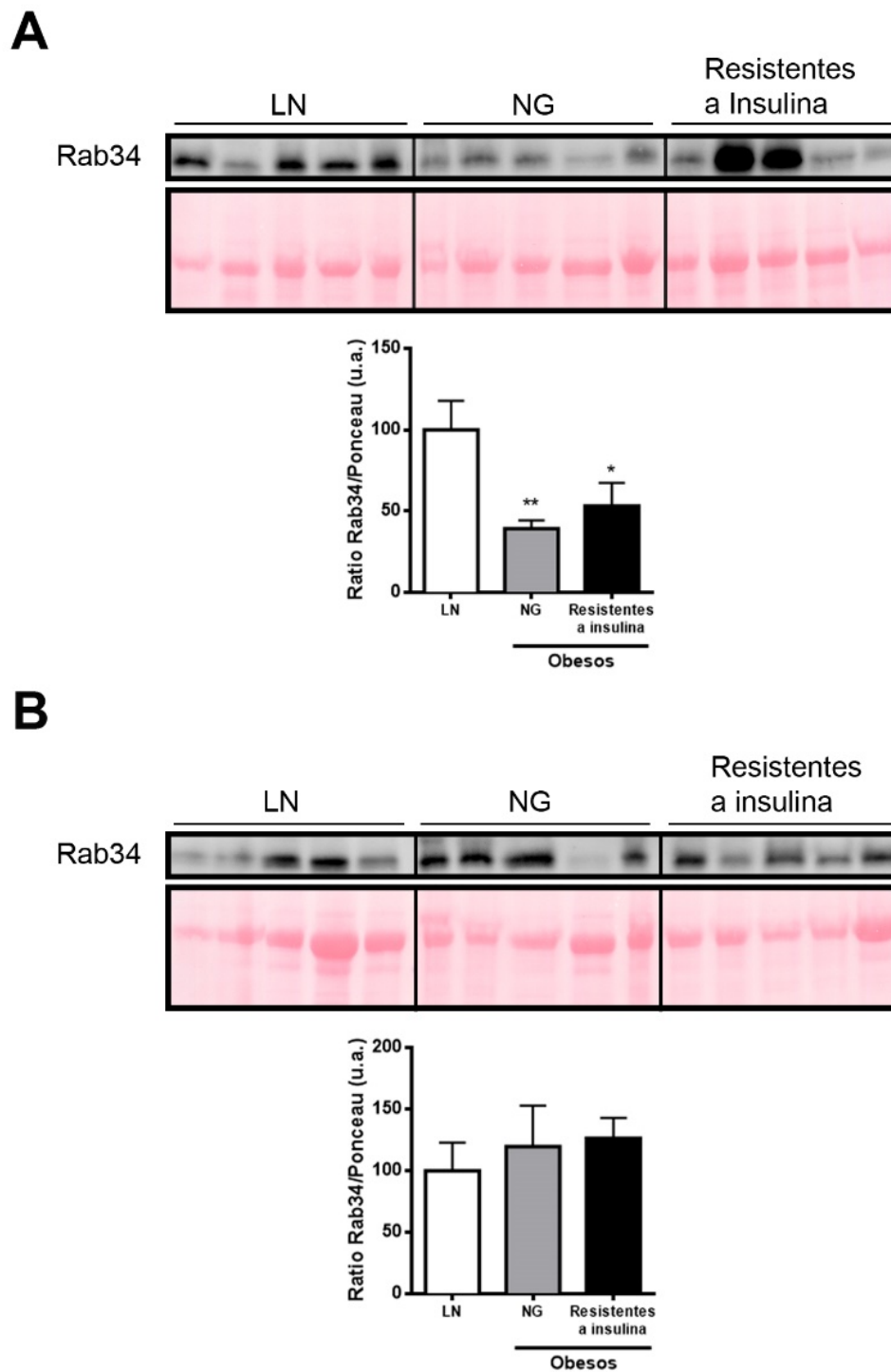
Adicionalmente, la distribución de esta GTPasa también se estudió en adipocitos maduros humanos aislados a partir de los depósitos de grasa omental y subcutánea. En estas células, caracterizadas por la gran gota lipídica que ocupa la práctica totalidad del citosol, Rab34 presentó una localización dual, colocalizando con marcadores del aparato de Golgi (GM130 y Arf1) y con el compartimento ERGIC (ERGIC53), así como con el marcador GLs PLIN1 (Fig. 47).



**Figura 47.** Localización de Rab34 en adipocitos humanos maduros del tejido adiposo (A) omental y (B) subcutáneo. Rab34 muestra una distribución dual en estas células, mostrando una colocalización tanto con el marcador PLIN, como con Arf1, GM130 y ERGIC53 en ambos tejidos. Barra de escala, 10  $\mu$ m.

Por otro lado, para investigar la contribución de Rab34 en relación a enfermedad metabólica cuantificamos el contenido de la GTPasa en extractos proteicos de muestras de tejido adiposo total de los depósitos subcutáneo y omental obtenidas a partir de pacientes delgados, así como de obesos normoglucémicos o con resistencia a insulina (Fig. 48). En dicho estudio se observó una disminución significativa de la expresión de Rab34 en tejido adiposo omental asociada a la variable obesidad e independiente de la presencia de resistencia a insulina (Fig. 48A). Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en el contenido de Rab34 en tejido adiposo subcutáneo (Fig. 48B).

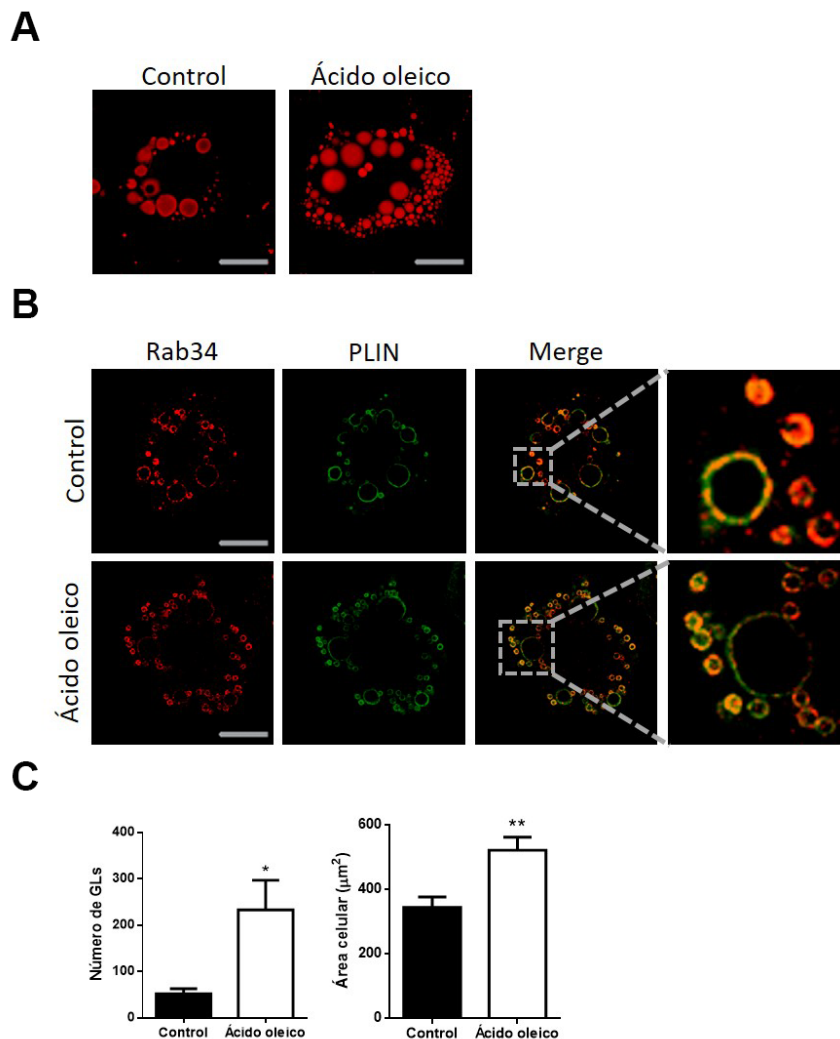




**Figura 48.** Análisis de expresión de Rab34 en tejido adiposo humano. Análisis de *Western blotting* y cuantificación de quimioluminiscencia de extractos proteicos de (A) TAV y (B) TASC Se muestra en cada caso el nivel de expresión de Rab34 en individuos delgados (LN; n = 5), obesos normoglucémicos (NG; n = 5) y obesos con resistencia a insulina (n = 5) y el nivel medio corregido con la carga total de proteína por calle (Ponceau) para cada condición. \*  $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  vs. LN.

Finalmente, se llevó a cabo el análisis de la expresión de Rab34 *in vitro* en modelos celulares de adipocitos 3T3-L1 que simulan las condiciones patofisiológicas de obesidad y resistencia a insulina (ver apartado 3.5.2).

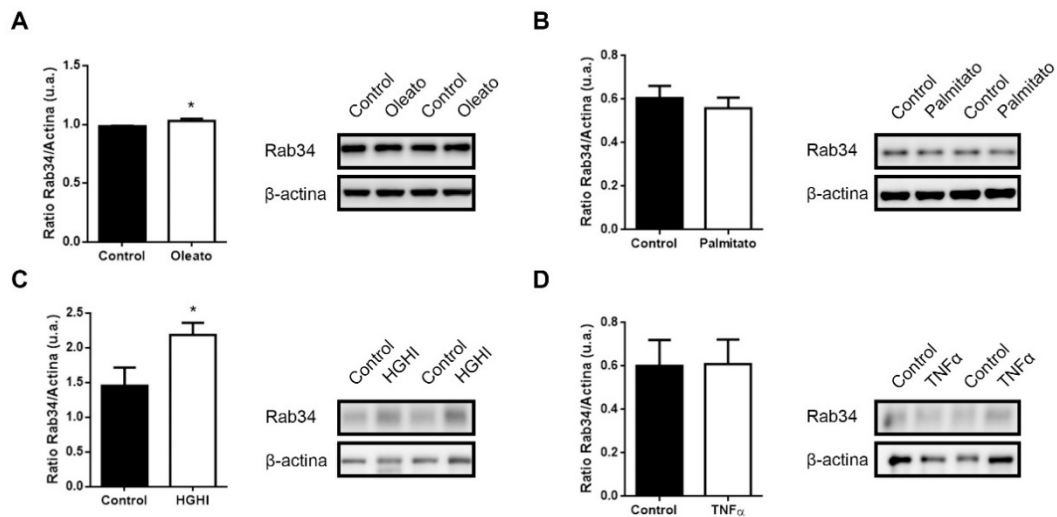
En primer lugar, la exposición a oleato, que induce hipertrofia sin resistencia a insulina (Díaz-Ruiz *et al.*, 2015), provocó un aumento significativo tanto en el número de GLs ( $P < 0,05$ ), como del área de las GLs ( $P < 0,01$ ) que tienen Rab34 asociadas respecto a las células control, como se observa en las imágenes de adipocitos 3T3-L1 doblemente marcados para Rab34 y PLIN1 (Fig. 49). Estos resultados se acompañaron de un aumento en el contenido total de la proteína Rab34, según muestran nuestros resultados de inmunoblot (Fig. 50A).



**Figura 49.** Células 3T3-L1 expuestas a ácido oleico 250 µM durante 18 horas y (A) teñidas con Oil Red O y (B) doble inmunoteñidas con anti-Rab34 (rojo) y anti-PLIN (verde). Barra de escala, 10 µm. (C) Cuantificación de número de gotas lipídicas (GLs) y área celular (en µm<sup>2</sup>). Los datos se representa como la media ± SEM, \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$  vs. Células no tratadas (Control).

De la misma manera, la exposición de los adipocitos a condiciones de hiperinsulinemia e hiperglucemia (alta glucosa y alta insulina, HGHI) también

incrementó significativamente los niveles de Rab34, respecto a lo observado en condiciones basales (Fig. 50C). Por otro lado, la exposición a palmitato o TNF- $\alpha$  no generaron variaciones significativas en la expresión de Rab34 en las células 3T3-L1 (Figs. 50 B y D).



**Figura 50.** Expresión de Rab34 en modelos celulares de obesidad y resistencia a insulina en adipocitos 3T3-L1. Diferentes estímulos metabólicos que generan hipertrofia y/o condiciones de resistencia a insulina [(A y B) 500  $\mu$ M oleato y 500  $\mu$ M palmitato, 18 h, (C y D) alta glucosa (4.5 g/L)/ alta insulina (100 nM) (HGHI) o 5 nM TNF- $\alpha$  durante 24 h]. Los datos están expresados como la media  $\pm$  SEM de n = 6 réplicas biológica \*,  $P < 0.05$  vs. Control.





# DISCUSIÓN



## 5.1. NECC2 es una proteína asociada a caveolas involucrada en la señalización de la insulina

Las caveolas han sido descritas como invaginaciones de la membrana celular, no recubiertas por clatrina, y son de particular relevancia en adipocitos (Pilch *et al.*, 2007; Pilch y Liu, 2011), en los que pueden representar alrededor del 50% de su superficie (Thorn *et al.*, 2003). Estos dominios especializados de membrana están involucrados en una amplia variedad de procesos celulares, entre los cuales están incluidos el transporte vesicular, la endocitosis y la transcitosis (Schnitzer *et al.*, 1995), y actúan además como importantes centros celulares coordinando la formación de complejos de señalización (Smart *et al.*, 1999). Las caveolas están constituidas por proteínas estructurales y del citoesqueleto, factores de *scaffolding*, colesterol y esfingolípidos, y una serie de moléculas de señalización (*i.e.* receptor de insulina, miembros de la cascada de la MAP quinasa, o el transportador de glucosa GLUT-4). En conjunto, estas proteínas son esenciales para la formación, mantenimiento y organización funcional de las caveolas (Engelman *et al.*, 1998; Okamoto *et al.*, 1998; Karlsson *et al.*, 2004; Yuan *et al.*, 2007; Richter *et al.*, 2008; Hayer *et al.*, 2010; Parton y del Pozo, 2013).

Nuestros estudios de diferenciación de células 3T3-L1, el tipo celular más comúnmente utilizado para este tipo de estudios, revelaron que tanto el contenido de ARNm como la expresión proteica de NECC2 aumentan progresivamente durante la adipogénesis, alcanzando su máximo nivel en adipocitos diferenciados. Estos resultados indican que, como se ha sugerido previamente para otras proteínas con largos dominios *coiled-coil* inducidas durante la diferenciación de los preadipocitos (de tipo fibroblasto) a adipocitos, como las golginas golgin-160 ó p115 (Williams *et al.*, 2007), NECC2 podría desempeñar un papel en la adquisición del fenotipo adipocitario. Estos resultados extienden nuestras observaciones previas sobre la expresión de NECC2 en órganos endocrinos (Cruz-García *et al.*, 2011).

Por otra parte, en estudios previos demostramos que NECC2 se encuentra asociado a caveolas en la línea celular neuroendocrina PC12 (Díaz-Ruiz *et al.*, 2013). Estos resultados, junto con la observación de que la inmunoseñal para NECC2 se localiza en parte en el citosol pero, fundamentalmente, en la superficie celular de los adipocitos 3T3-L1, nos llevó a investigar si, como en células PC12, NECC2 podría estar asociado a las caveolas en estas células. Así, mediante inmunotinción doble utilizando anticuerpos para el marcador de caveolas, CAV1, y para NECC2 y microscopía confocal en adipocitos 3T3-L1 observamos que



NECC2 colocaliza con CAV1 en la superficie celular, sugiriendo que esta proteína podría estar asociada a caveolas en adipocitos. Además, la inmunoseñal para NECC2 también mostró un alto grado de coincidencia espacial con la distribución de la actina cortical, que se ha descrito que se distribuye a lo largo de la cara interna de los *clusters* o rosetas en los que se organizan las caveolas en este tipo celular (Parton y del Pozo, 2013). En esta línea, se ha propuesto que la actina cortical, que se asocia en particular al cuello de las caveolas (Foti *et al.*, 2007), regula la localización de CAV1 y la dinámica (internalización y tráfico) de estas *lipid rafts* enriquecidas en colesterol (Kanzaki y Pessin, 2002; Mundy *et al.*, 2002; Sverdlov *et al.*, 2009; Head *et al.*, 2014; Echarri y del Pozo, 2015). En este sentido, la exposición de los adipocitos 3T3-L1 a latrunculina B para causar la despolimerización de actina disminuyó significativamente la colocalización entre NECC2 y la actina cortical. Curiosamente, mediante estudios de microscopía electrónica se ha demostrado la presencia de una estructura densa a los electrones (i.e., rica en proteínas) que parece conectar las caveolas con los filamentos de actina (Echarri y del Pozo, 2015), en la que podría localizarse NECC2. Lamentablemente, los anticuerpos de los que disponemos de NECC2 no permiten la identificación de esta proteína en estudios de microscopía electrónica. No obstante, el tratamiento con latrunculina B no modificó el grado de solapamiento entre las señales inmunofluorescentes de las proteínas NECC2 y CAV1 endógenas en los adipocitos. Estos resultados estarían de acuerdo con estudios previos de otros autores en los que se demostró que los adipocitos 3T3-L1 expuestos a tratamientos con latrunculina B no ven afectadas ni la integridad ni la abundancia de sus caveolas (Foti *et al.*, 2007; Kanzaki y Pessin, 2002). En conjunto, nuestros estudios de microscopía indican que la asociación de NECC2 con caveolas no depende de actina. Sin embargo, la disminución del colesterol de membrana inducida mediante el tratamiento de las células con metil- $\beta$ -ciclodextrina, que extrae el colesterol de las membranas y ha sido utilizado previamente para la desorganización de *lipid rafts* en adipocitos (Shigematsu *et al.*, 2003), redujo la colocalización entre NECC2 y CAV1 en células 3T3-L1. Vistos en conjunto, nuestros resultados demuestran que NECC2 se encuentra localizada en caveolas en los adipocitos 3T3-L1. Nuestras observaciones también son consistentes con la noción de que la asociación de NECC2 con caveolas podría ocurrir a través de su interacción con el colesterol presente en las caveolas por medio de sus dominios CRAC.

En este contexto, los experimentos de extracción de membranas enriquecidas en caveolas utilizando un método libre de detergentes junto con los estudios de fraccionamiento subcelular sugieren que NECC2 no es una proteína periférica de membrana si no que se comporta como una proteína soluble que estaría presente en la cara citosólica

de las caveolas. Estos resultados están en línea con nuestras observaciones previas en las células neuroendocrinas PC12, en las que NECC2 presenta el mismo perfil de distribución (i.e., en fracciones citosólicas) en experimentos de extracción con detergentes no iónicos y fraccionamiento subcelular en gradiente de sacarosa (Díaz-Ruiz *et al.*, 2013). De manera similar, las cavininas son proteínas solubles con dominios *coiled-coil* (cremalleras de leucina) y residuos básicos que se localizan igualmente en la cara citosólica de las caveolas (Kovtun *et al.*, 2015; Shvets *et al.*, 2015). Notablemente, se ha observado que las proteínas con largos dominios *coiled-coil* presentes en el aparato de Golgi, las golginas, siguen ciclos de asociación/disociación entre el citosol y las membranas del Golgi, al que se anclan mediante proteínas de unión asociadas al aparato de Golgi (Gillingham *et al.*, 2016; Witkos y Lowe, 2015). Así, además de por su potencial interacción con lípidos de la membrana plasmática, NECC2 podría residir en los *lipid rafts* gracias a su interacción con proteínas que se encuentran asociadas a caveolas. En este sentido, se ha propuesto que los sitios de N-miristoilación presentes en proteínas tales como NECC2 permiten el establecimiento de interacciones débiles proteína-proteína y proteína-lípido (Farazi *et al.*, 2001; Head *et al.*, 2014) y, por tanto, desempeñan un papel importante en el *targeting* de las proteínas a la membrana y en las uniones proteína-proteína (Rowe *et al.*, 2006). No obstante, todavía queda por esclarecer la relevancia de los dominios CRAC y/o sitios N-miristoilación de la secuencia de NECC2 en relación a su capacidad de unión a caveolas.

Las caveolas juegan un papel crucial en la compartimentación espacial de la señalización de la insulina (Kabayama *et al.*, 2007). Está claramente establecido que la insulina regula sus células diana mediante la activación de una compleja red de señalización. La activación de esta red de señalización se produce tras la unión de la insulina a su receptor, que se encuentra localizado en caveolas (Gustavsson *et al.*, 1999; Foti *et al.*, 2007). Esta distribución específica se produce gracias a la interacción del receptor de insulina (IR) con proteínas del citoesqueleto distribuidas en la cara citosólica de las caveolas y que están particularmente enriquecidas en estos microdominios de la membrana plasmática (Foti *et al.*, 2007). En este estudio, nuestras observaciones mostraron que NECC2 colocaliza con el IR a nivel de la superficie celular. En este sentido, estudios iniciales en células CHO expresando el IR humano mostraron que este receptor puede internalizarse tras la estimulación de las células con insulina (Carpentier, 1993). Sin embargo, datos recientes en adipocitos primarios de rata han puesto de manifiesto que alrededor del 92% de los receptores de insulina permanecen en la membrana plasmática tras el tratamiento con insulina (Fagerholm *et al.*, 2009). En este contexto, observamos que el grado de colocalización entre NECC2 y el IR no

disminuye en adipocitos 3T3-L1 expuestos a un tratamiento de insulina. En esta misma línea están nuestros resultados demostrando que la exposición de los adipocitos 3T3-L1 a insulina no redujo el grado de colocalización entre NECC2 e IR en la superficie celular. De hecho, estos experimentos mostraron que se produce un aumento en la acumulación de NECC2 en la superficie celular después de la exposición de los adipocitos a insulina, sugiriendo que esta hormona induce el reclutamiento de NECC2 hacia la superficie celular. Se han encontrado resultados similares para la proteína *sustrato 1 del receptor de insulina* (IRS-1), una proteína adaptadora crítica en la ruta de señalización de la insulina, que también se acumula en la superficie celular en respuesta a la estimulación aguda con insulina (Mundy *et al.*, 2002; Stenkula *et al.*, 2007). Curiosamente, estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que NECC2 colocaliza con el receptor del factor de crecimiento neuronal (NGF), TrkA, a nivel de las caveolas en células neuroendocrinas PC12, y que la cantidad de inmunoseñal para NECC2 en la superficie de estas células se ve aumentada tras la exposición a NGF (Díaz-Ruiz *et al.*, 2013). En conjunto, nuestros resultados, tanto en adipocitos 3T3-L1 como en células neuroendocrinas PC12, sugieren que NECC2 podría actuar en las caveolas como un mediador común en la señalización activada por factores de crecimiento (insulina y NGF, respectivamente), probablemente a través su interacción, directa o indirecta, con sus receptores respectivos, IR y TrkA.

En particular, nuestros resultados de microscopía confocal y bioquímicos sugieren que NECC2 podría estar involucrada en la señalización de insulina en adipocitos. Puesto que la activación de la ruta PI3K/Akt por el IR requiere de un microambiente lipídico enriquecido en colesterol (Parpal *et al.*, 2001), y que es necesaria la interacción del IR con el citoesqueleto para conseguir una activación apropiada de la ruta ERK1/2 (He *et al.*, 2003), decidimos analizar el efecto de la modulación del contenido de NECC2 en adipocitos 3T3-L1 sobre la activación de estos efectores de la insulina mediada por el IR. Observamos que la sobreexpresión de NECC2 mediante la transfección transitoria de células 3T3-L1 con el vector GFP-NECC2 produjo una estimulación sostenida de la fosforilación de Akt (i.e., activación de Akt) activada por insulina. Se ha propuesto que la activación prolongada de Akt conlleva a una inhibición de señalización de insulina y, por lo tanto, resistencia a insulina (Nagoshi *et al.*, 2005; Ozes *et al.*, 2001). Sorprendentemente, la sobreexpresión de NECC2 no tuvo efecto sobre la activación de ERK1/2 dependiente de IR, que también ocurre en respuesta a la unión de la insulina a su receptor (Frojdo *et al.*, 2009). Por otro lado, la disminución en la expresión de NECC2 en adipocitos 3T3-L1 mediante silenciamiento con un vector shRNA redujo la fosforilación de los dos efectores intracelulares, Akt y ERK1/2, en respuesta a insulina. Estos

resultados, junto con los datos de sobreexpresión de NECC2, sugieren que se requieren niveles apropiados de expresión de NECC2 para una correcta actividad del IR. En este sentido, nuestros estudios previos en células neuroendocrinas mostraron que tanto la sobreexpresión como el silenciamiento de NECC2 redujeron la fosforilación de ERK1/2 activada por NGF, mientras que la fosforilación de Akt no se vio afectada en células en las que los niveles de expresión de NECC2 fueron incrementados o disminuidos mediante sobre-expresión y silenciamiento, respectivamente (Díaz-Ruiz *et al.*, 2013). Estas observaciones, en conjunto, apoyan la participación de NECC2 en el mantenimiento de la función de las caveolas como plataformas de señalización regulando selectivamente, de manera dependiente del tipo celular, cascadas específicas de señalización.

## **5.2. Regulación de NECC2 en respuesta a estímulos obesigénicos y en resistencia a insulina**

En relación con nuestros hallazgos sobre NECC2 en adipocitos 3T3-L1, y dada la estrecha relación entre obesidad y resistencia a insulina/diabetes tipo 2 (T2D) (Kahn y Flier, 2000), examinamos la expresión de NECC2 en tejido adiposo de pacientes con diferentes grados de sensibilidad a la insulina. Estos estudios mostraron que, independientemente del depósito graso y del sexo de los individuos, la obesidad está asociada con un incremento en los niveles de NECC2. Esto podría representar una respuesta adaptativa de los adipocitos para superar las alteraciones provocadas como consecuencia del incremento de la acumulación de lípidos que ocurre en obesidad. Sin embargo, aunque observamos una tendencia hacia unos mayores niveles de expresión de ARNm de *NECC2* en individuos obesos normoglucémicos en comparación con sujetos delgados tanto en el depósito graso subcutáneo como el visceral, estos niveles alcanzaron significación estadística solamente cuando los individuos obesos mostraron resistencia a insulina (IGT y/o T2D). Estos cambios se asemejan a los observados previamente para *CAV1* en tejido adiposo humano (Catalan *et al.*, 2008). En conjunto, estos resultados, junto a nuestros hallazgos morfológicos y funcionales en células 3T3-L1, sugieren un papel para NECC2 en obesidad y en el desarrollo de las alteraciones del metabolismo de la glucosa asociados a la obesidad.

Finalmente, con el fin de obtener una visión de los mecanismos que regulan la expresión de NECC2 en el tejido adiposo, evaluamos el contenido de esta proteína en

modelos *in vitro* de hipertrofia y/o resistencia a insulina de adipocitos (Buren *et al.*, 2003; Yeop *et al.*, 2010; Díaz-Ruiz *et al.*, 2015). Así, observamos que la inducción de hipertrofia (mediante exposición a ácido oleico) o de resistencia a insulina (por exposición a concentraciones elevadas de glucosa e insulina) provocaron un aumento significativo de los niveles proteicos de NECC2 en adipocitos 3T3-L1, lo que va acorde en gran medida con los cambios observados en nuestros estudios en tejido adiposo humano. Por el contrario, e inesperadamente, ni la exposición de las células 3T3-L1 a palmitato ni al estímulo proinflamatorio inducido por TNF- $\alpha$ , que hemos demostrado previamente que provocan resistencia a insulina junto con hipertrofia o solamente resistencia a insulina, respectivamente (Díaz-Ruiz *et al.*, 2015), modificaron significativamente el contenido de NECC2 en las células 3T3-L1. Estos resultados concuerdan con observaciones previas de nuestro laboratorio y otros grupos indicando que los diferentes factores o procesos que operan en obesidad (*i.e.* citoquinas, lípidos, glucosa, hipoxia, fibrosis, etc.) pueden activar respuestas celulares distintas en los adipocitos (Buren *et al.*, 2003; Yeop *et al.*, 2010; Díaz-Ruiz *et al.*, 2015). En este contexto, parece razonable proponer que la expresión elevada de NECC2 observada en individuos obesos resistentes a insulina es el resultado de la activación de múltiples procesos de estrés celular en los adipocitos obesos.

En conclusión, nuestros datos proporcionan la primera demostración de la asociación de una proteína con largos dominios *coiled-coil*, NECC2, con caveolas en adipocitos, e identifica a esta proteína como un regulador potencial del sistema insulina/IR en adipocitos. Adicionalmente, estos resultados sugieren que la acumulación de NECC2 en tejido adiposo humano podría contribuir, al menos en parte, al desarrollo de resistencia a insulina en obesidad.

### 5.3. Rab34 es un componente de la cubierta de las GLs

La visión inicial de las GLs como simples orgánulos encargados del almacenaje de energía, con funciones limitadas, ha cambiado notablemente en los últimos años. De esta manera, en la actualidad se acepta que son orgánulos altamente dinámicos y complejos, que intervienen en importantes procesos celulares, entre los que se incluye necesariamente el almacenaje y movilización de la energía almacenada de una forma estrictamente regulada (Reue, 2011; Malagón *et al.*, 2013). Este cambio de paradigma ha estado sustentado en gran medida por la identificación de proteínas asociadas a las GLs, fundamentalmente mediante

estudios proteómicos de GLs aisladas bien a partir de adipocitos o de otros tipos celulares que presentan GLs en su citosol, bajo condiciones normales o en condiciones patológicas, como los hepatocitos (revisado por Zehmer *et al.*, 2009; Hodges y Wu, 2010; Kühnlein, 2011; Yang *et al.*, 2012; Rabanal, 2014; Gao y Goodman, 2015; Hashemi y Goodman, 2015). Así, los estudios proteómicos pioneros de Brasaemle y colaboradores en GLs de adipocitos 3T3-L1 revelaron que la estimulación de la lipólisis mediante agonistas  $\beta$ -adrenérgicos incrementa el número de proteínas asociadas a la superficie de las GLs tales como ADRP, CAV1 y proteínas Rab GTPasas, como Rab18 (Brasaemle *et al.*, 2004). Más recientemente, un estudio proteómico de GLs nos permitió identificar, por primera vez, la presencia de un miembro adicional de la familia Rab, Rab34, en la cubierta de las GLs de células 3T3-L1, tanto en condiciones basales como tras la estimulación de las células con insulina (Rabanal, 2014).

Este hallazgo fue probablemente posible porque las células 3T3-L1 utilizadas en dicho estudio proteómico estaban en etapas avanzadas de diferenciación (día 10). De hecho, como muestran nuestros resultados de microscopía confocal tanto en células 3T3-L1 como en adipocitos humanos diferenciados *in vitro*, Rab34 presenta una localización dual en adipocitos, i.e. aparato de Golgi y/o GLs, dependiente del estadio de diferenciación (temprano o tardío), y del nivel de expresión de dicha proteína (nivel fisiológico o sobreexpresión).

En relación a su distribución en el aparato de Golgi, observamos que dicha localización es característica de células 3T3-L1 no diferenciadas, que mantienen aún su fenotipo fibroblástico carente de GLs. Esta localización es similar a la descrita en los primeros estudios sobre Rab34, que se llevaron a cabo en células NRK (*normal rat kidney*) (Wang y Hong, 2002). Estos y otros estudios posteriores demostraron que Rab34 en el Golgi, particularmente en el TGN, regula el tráfico y acumulación de los lisosomas en las proximidades del Golgi mediante su interacción con la proteína RILP que, entre otras acciones, actúa como efector de otra proteína Rab que se localiza en la membrana de los lisosomas, Rab7, y que también contribuye al transporte de los lisosomas hasta la región peri-Golgi mediante su interacción con el sistema motor dinactina/dineina asociado a microtúbulos (Wang y Hong, 2002; Kasmapour *et al.*, 2012; Alloati *et al.*, 2015; Starling *et al.*, 2016). Por otra parte, estudios en células HeLa, en las que Rab34 también se localiza en el aparato de Golgi, han demostrado que esta GTPasa interviene en la salida de las vesículas de transporte a partir del TGN, en su transcurso a través de la ruta secretora anterógrada (Goldenberg *et al.*, 2007). En conjunto, estos datos indican que Rab34 puede realizar distintas funciones asociadas al Golgi de forma dependiente de tipo celular.

Curiosamente, en nuestro estudio observamos que, al menos en células 3T3-L1 a días iniciales de diferenciación, Rab34 se localiza tanto en la región cis-medial del Golgi como en el TGN, como muestra la colocalización de esta GTPasa con marcadores de dichos compartimentos, GM130 y syntaxina 6, respectivamente. Como se mencionó en la introducción, se han descrito en torno a 20 proteínas Rab en asociación con el aparato de Golgi, que recientemente se han clasificado en dos grupos atendiendo a sus características funcionales, en particular, al efecto que tiene su activación o inactivación sobre la estructura del Golgi *ribbon* (Liu y Storrie, 2015). Así, Liu y Storrie (2015) definen el Grupo I de Rabs asociadas al Golgi como aquellas cuya sobreexpresión tiene poco efecto sobre la organización del Golgi *ribbon*, mientras que su inactivación induce la fragmentación del mismo y/o a redistribución de las enzimas del Golgi hacia el RE, mientras que las del Grupo II serían aquellas para las que se cumple la regla inversa. En este sentido, nuestros experimentos muestran que la expresión de niveles elevados de Rab34 mediante transfección con el vector GFP-Rab34 en células 3T3-L1 indiferenciadas, en las que la proteína exógena se distribuye asociada al Golgi, induce la fragmentación/vesiculación de este orgánulo. Estos resultados indican la importancia de Rab34 en el mantenimiento de la integridad estructural del aparato de Golgi y, aunque no hemos realizado estudios de silenciamiento para este análisis concreto, apoyan la clasificación de Rab34 como perteneciente al Grupo II de proteínas Rab del Golgi. Otra proteína Rab asociada al Golgi y relacionada parcialmente con Rab34 a nivel de secuencia, Rab6 (Fukuda, 2008), se define como el representante tipo del Grupo II de proteínas Rab del Golgi (Liu y Storrie, 2015). Concretamente, se ha demostrado que Rab6 interviene tanto en el transporte retrógrado Golgi-RE como en el transporte anterógrado (del Golgi a la membrana plasmática) (Heffernan y Simpson, 2014), lo que se ha relacionado con la capacidad de esta GTPasa para reclutar proteínas motoras (Liu y Storrie, 2015).

En conjunto, nuestros resultados de localización y de sobreexpresión de Rab34 sugieren que esta GTPasa podría participar en la formación de vesículas de transporte generadas a partir de cisternas del aparato de Golgi. De hecho, además de en estructuras de tipo cisterna, observamos que la inmunoseñal de Rab34 se asociaba a vesículas cercanas a la zona perinuclear donde se localiza el Golgi, lo que nos llevó a estudiar su colocalización con marcadores de las vesículas vinculadas a este orgánulo. Estos estudios mostraron que Rab34 se asocia a vesículas COPI, ya que colocaliza con Arf1, y ocasionalmente, a vesículas COPII (marcadas con Sec23). Estos datos relacionaban a Rab34 fundamentalmente con el transporte retrógrado de vesículas, bien intra-Golgi o entre Golgi y RE. En esta línea, observamos igualmente que Rab34 colocaliza con la proteína ERGIC53 demostrando que

también se distribuye, al menos parcialmente, en asociación con el ERGIC. Notablemente, el análisis temporal del grado de colocalización de Rab34 con los marcadores de Golgi, RE y vesículas asociadas mostró un cambio progresivo en la distribución de esta proteína en dirección retrógrada, desde el aparato de Golgi hacia ERGIC a lo largo de la adipogénesis. Así mientras que a días iniciales (0 y 3 tras el inicio de la diferenciación), Rab34 muestra un considerable grado de colocalización con syntaxina 6 y GM130 y, en menor medida, con Arf1, dicha colocalización disminuye a día 6, lo que se acompaña con un incremento transitorio en la co-distribución de Rab34 con ERGIC53 a día 3, justo cuando tiene lugar la expresión de marcadores de diferenciación tardíos (enzimas lipogénicas y lipolíticas así como otras proteínas implicadas en el metabolismo lipídico) en las células 3T3-L1 (Ntambi y Young-Cheul, 2000). En este sentido, y teniendo en cuenta las funciones generales de las proteínas Rab en el tráfico de cargo (Stenmark, 2009; Diekmann *et al.*, 2011; Li y Marlin, 2015), cabe la posibilidad de que Rab34 pudiera contribuir al tráfico de proteínas desde el Golgi, tras su maduración en este orgánulo, hasta el compartimento intermedio RE-Golgi, para permanecer en el RE o ser distribuidas hacia otros destinos, incluyendo las GLs. Se ha estimado que entre un 6-30% de las proteínas glicosiladas en el Golgi viajan de vuelta al RE (Heffernan y Simpson, 2014). Por otra parte, el ERGIC podría servir también como punto de partida para que la propia Rab34 circule hasta su siguiente destino temporal, las GLs. De hecho, en días más avanzados de diferenciación, cuando las células 3T3-L1 empiezan a acumular GLs (a partir de día 3-4 de diferenciación en adelante en nuestras células), la asociación de Rab34 con el aparato de Golgi se pierde y se asocia entonces a la superficie de las GLs, colocalizando con el marcador constitutivo de estos orgánulos, PLIN1 (Wolins *et al.*, 2006). El hecho de que esta GTPasa se asocie a las GLs tan pronto como las células comienzan a acumularlas, apoya la idea de que Rab34 podría representar un marcador de diferenciación de los adipocitos, al menos en cuanto a su distribución se refiere. Respecto a su concentración, ésta aumenta a día 6 y aún más a día 10, probablemente como consecuencia del aumento en el número y tamaño de las GLs que ocurre durante ese periodo de diferenciación avanzada.

Existen diferentes rutas a través de las cuales las proteínas pueden llegar a la superficie de las GLs: 1) procedentes del RE durante su formación por difusión o a través de transporte vesicular y/o los puentes que conectan el RE y las GLs maduras, 2) desde el citosol mediante hélices anfipáticas o anclajes lipídicos o mediante su interacción a otras proteínas de la cubierta de las GLs (Jacquier *et al.*, 2011; Walther y Farese, 2012; Hashemi y Goodman, 2015; Kory *et al.*, 2016). Teniendo en cuenta el aumento de la colocalización de Rab34 con ERGIC53 justo antes de su asociación con GLs, junto con la estrecha aposición descrita entre



las GLs y el compartimento ERGIC y ERES (Soni *et al.*, 2009), es razonable sugerir que la transferencia de Rab34 a las GLs nacientes al inicio de la adquisición del fenotipo adipocitario podría ocurrir, al menos parcialmente, a través del compartimento ERGIC. Los estudios sobre transferencia de proteínas a las GLs (i.e., ATGL) a través del RE apoyan la idea de que este proceso ocurre a través de un mecanismo dependiente del sistema Arf1/COPI (Soni *et al.*, 2009). Sin embargo, llama la atención que en el entorno temporal en el que Rab34 coincide más espacialmente con ERGIC53 (etapas tempranas de diferenciación), la colocalización de Rab34 con Arf1 disminuye, lo que sugiere que quizás esta vía podría no ser (totalmente) responsable del tráfico de Rab34 a las GLs durante la biogénesis de estos orgánulos que ocurre a etapas intermedias de la adipogénesis. Puesto que se ha demostrado que las GLs nacientes permanecen unidas al RE (Walther y Farese, 2012; Pol *et al.*, 2014; Kory *et al.*, 2016), cabe la posibilidad de que durante ese periodo Rab34 alcance la superficie de dichas GLs desde el RE por simple difusión. Dicho esto, tras un periodo intermedio en el que Rab34 y Arf1 no parecen colocalizar (Arf1 permanece aún ligado al Golgi, mientras que Rab34 está asociada a las GLs), ambas proteínas vuelven a colocalizar posteriormente a nivel de las GLs, localización que ya se había descrito para Arf1 en adipocitos maduros en otros estudios (Rabanal, 2014; Hashemi y Goodman, 2015).

En este punto, es importante mencionar los resultados obtenidos sobre Rab34 en células HepG2, que recapitulan en gran medida los observados en adipocitos 3T3-L1 y humanos. Concretamente, en condiciones basales, Rab34 se asocia al Golgi/vesículas COPI/ERGIC en hepatocitos, mientras que la formación de GLs en estas células en respuesta a la exposición prolongada a ácidos grasos provoca la translocación de Rab34 desde su posición basal a las GLs, presumiblemente mediante la vía retrógrada de transporte vesicular a través de ERGIC. El conjunto de resultados en hepatocitos y en adipocitos, murinos y humanos, refuerza la idea del papel de Rab34 como marcador de la formación y/o mantenimiento de las GLs en condiciones normales y, presumiblemente, también en condiciones patológicas (exceso de lípidos).

Los resultados sobre la colocalización de Rab34 y Arf1 en las GLs podría sugerir la existencia de una relación funcional entre ambas proteínas. En esta línea están nuestros datos del interactoma de Rab34, que muestran que dicha interacción se produce tanto en preadipocitos como en adipocitos, así como en hepatocitos, tratados o no con oleato. Más aún, estos mismos estudios revelan que Rab34 interacciona además con varias subunidades de la cubierta de coatómeros COPI, entre las cuales COP $\beta$  y COP $\gamma$ 1 se ha mostrado que interaccionan directamente con Arf1 durante el proceso de formación de la cubierta COPI

(revisado por Beck *et al.*, 2009). Curiosamente, la salida de proteínas a partir de los puntos de salida del RE, ERES, aunque es mediada inicialmente por vesículas COPII, el transporte subsiguiente se produce a través de los intermediarios túbulo-vesiculares del ERGIC que están asociados a la cubierta COPI, en un proceso que es dependiente de Arf1/GBF1 (Beck *et al.*, 2009). Considerados en conjunto, todos nuestros resultados apoyan la idea de una interacción funcional entre Rab34 y Arf1. En este sentido, diversos estudios han demostrado que el sistema Arf1/COPI es necesario para el transporte de proteínas importantes en la fisiología de las GLs, incluyendo ATGL, PLIN2 o GPAT4 (Nakamura *et al.*, 2004; Beller *et al.*, 2008; Soni *et al.*, 2009; Wilfling *et al.*, 2014; Gao y Goodman, 2015). Más aún, estos estudios han permitido establecer que la inhibición de Arf1 mediante silenciamiento o tratamiento farmacológico (con brefeldina A), además de disminuir la asociación de ATGL a la superficie de las GLs, provoca un aumento del tamaño de las GLs en las células, lo que se ha propuesto que es debido a la disminución de la lipólisis provocada por el bloqueo del acceso de la lipasa a estos orgánulos (revisado por Gao y Goodman, 2015). En concordancia con estos resultados están nuestros datos de silenciamiento en adipocitos diferenciados, que muestran que la disminución de los niveles de Rab34 provoca una disminución significativa de la lipólisis y un aumento concomitante de la cantidad de triglicéridos almacenados en las células silenciadas. Notablemente, PLIN2 que, como ATGL, llega a las GLs vía Arf1/COPI, reduce la lipólisis basal protegiendo a las GLs del acceso de ATGL (revisado por Kimmel y Sztalryd, 2016). Teniendo en cuenta estos resultados, cabe por tanto la posibilidad de que, mediante su interacción con Arf1, Rab34 pudiera intervenir en el tráfico de PLIN2 y/o ATGL a la superficie de las GLs (no así en el contenido total de estas proteínas, que no se modifica en células silenciadas para Rab34). En esta línea, las imágenes de microscopía confocal en células HepG2 tratadas con oleato muestran la aposición de estructuras tubulares marcadas con Rab34 en estrecha aposición con la PLIN2 que rodea las GLs, lo que está en concordancia igualmente con la propuesta de Soni y colaboradores (2009) sobre la existencia de un compartimento del RE especializado en la transferencia de proteínas a través de vesículas (Arf1/COPI) dirigidas a las GLs. Cabe especular con la idea de que dicha transferencia no se produzca exactamente a través de vesículas si no de los puentes que conectan las GLs (en crecimiento o maduras) y el RE, cuyo mantenimiento se ha demostrado recientemente que depende de la maquinaria Arf1/COPI (Wilfling *et al.*, 2014). La realización de estudios de bloqueo de Arf1 con brefeldina A nos permitiría confirmar si Rab34 depende de Arf1 para realizar su función y, si en tal caso, Rab34 regula, como Arf1, el tráfico de las proteínas ATGL y PLIN2 a las GLs. A diferencia de lo observado para ATGL o PLIN2, el silenciamiento de Rab34 provocó una disminución significativa del contenido de la lipasa HSL en los adipocitos, que podría contribuir a la

disminución de la lipólisis observada en los adipocitos silenciados. Desconocemos el mecanismo que puede mediar este efecto. En esta línea, recientemente se ha demostrado que cambios en el contenido de otra proteína Rab, concretamente Rab32, resulta en cambios en la expresión de ATGL en hepatocitos, aunque ambas proteínas no interactúan directamente (Li *et al.*, 2016).

Adicionalmente, es posible que Rab34 pudiera participar también en la transferencia a las GLs de otra proteína que llega a éstas vía Arf1/COPI, la enzima responsable de la síntesis de triglicéridos GPAT4 (Jacquier *et al.*, 2011; Kory *et al.*, 2016), en vista de que la sobreexpresión de Rab34, en particular en días tempranos de diferenciación, aumenta el tamaño de las GLs y la acumulación de triglicéridos en las células 3T3-L1.

En relación con la lipogénesis, nuestros estudios de videomicroscopía en tiempo real en células 3T3-L1 expuestas a oleato nos han permitido observar que Rab34 se asocia a estructuras corticales que se asemejan a lamelipodios, los cuales terminan por formar estructuras irregulares o redondeadas en la superficie cortical de las células. Estos resultados replican observaciones previas obtenidas mediante videomicroscopía en adipocitos tratados con oleato, que mostraban la acumulación de lípidos en lamelipodios (Nagayama *et al.*, 2007). Estas observaciones son compatibles con estudios realizados en otros tipos celulares, como COS-1, en los que se ha descrito que Rab34 colocaliza con actina en lamelipodios así como en vesículas periféricas cercanas a la superficie celular, habiéndose propuesto un papel para esta GTPasa en la regulación de la macropinocitosis (Sun *et al.*, 2003). Notablemente, Rab7 y Rab21, que aparecen en el interactoma de Rab34, también están involucradas en macropinocitosis (Swanson 2008; Egami *et al.*, 2016). En nuestros estudios, las estructuras invaginadas que se marcan con GFP-Rab34 en la superficie, se transportan hacia el interior de las células, siguiendo una ruta similar a la descrita en los estudios de seguimiento de los lípidos endocitados en adipocitos por Nagayama *et al.* (2007). Estos resultados sugieren un papel de Rab34 en el tráfico intracelular de lípidos, que podría estar mediado mediante la interacción de esta proteína con elementos del citoesqueleto, tales como los motores moleculares miosina y dineína (transporte retrógrado), los componentes de los microfilamentos (actina) y de los microtúbulos (tubulina), o el complejo chaperonina encargado del plegamiento de la actina y tubulina (TCP-1), como muestran nuestros estudios del interactoma de Rab34. Estos resultados estarían en línea con los estudios que muestran la existencia de una importante relación entre las GLs y el citoesqueleto y sus proteínas motoras asociadas (revisado por Horgan y McCaffrey, 2011), así como con el transporte retrógrado de vesículas Golgi-ER a través de microtúbulos (Murshid y Presley, 2004).

En resumen, los resultados obtenidos en adipocitos a diferentes etapas de diferenciación, junto con los observados en hepatocitos, apoyan un papel de Rab34 en el funcionamiento de estas células, tanto en asociación al Golgi como, fundamentalmente, a las GLs, presumiblemente participando en el transporte de proteínas relevantes en la fisiología de las GLs así como en el tráfico de las propias GLs. Siguiendo este argumento, nuestras observaciones permitían predecir la presencia de alteraciones de Rab34 en condiciones en las que los adipocitos (o los hepatocitos) están afectados, como ocurre en obesidad.

#### **5.4. Regulación de Rab34 en respuesta a estímulos obesigénicos y en resistencia a insulina**

Como se ha mencionado en apartados anteriores, en adipocitos humanos diferenciados *in vitro*, tanto del depósito subcutáneo como del visceral, Rab34 localiza con marcadores de Golgi, como Arf1, a días tempranos de diferenciación, y con el marcador de GLs, PLIN1, en etapas más avanzadas de la adipogénesis, cuando también colocaliza con la proteína Arf1 asociada a las GLs. Curiosamente, en adipocitos maduros aislados directamente de tejido adiposo humano fresco, subcutáneo o visceral, se observa que Rab34 se localiza, junto con PLIN1, en ciertas partes de la periferia de la gran GL característica de estas células. Sorprendentemente, en estas células, Rab34 también se asocia al Golgi de la región perinuclear, donde solapa de manera significativa con el marcador del ERGIC, ERGIC53, y en cierta medida, también con Arf1. La coexistencia de esta localización dual de Rab34 en los adipocitos maduros humanos, que también se observa cuando sobreexpresamos GFP-Rab34 en adipocitos 3T3-L1, sugiere que esta proteína participa de alguna forma en la conexión dinámica entre Golgi-RE-GLs. Es posible que, en estas condiciones, ayude al tráfico de proteínas desde sus compartimentos de síntesis y maduración hasta la superficie de las GLs. Esta posible función se vería alterada en condiciones de obesidad, al menos en los adipocitos del tejido adiposo subcutáneo, donde hemos observado que los niveles de Rab34 están disminuidos. Resulta sorprendente que no se observen cambios en Rab34 en grasa visceral, que es el depósito que comúnmente se ha asociado al desarrollo de enfermedad metabólica en obesidad, si bien se ha establecido claramente el papel que juega la grasa subcutánea en la capacidad de expansión (i.e.,

acumulación de lípidos) del tejido adiposo en obesidad (Malagón *et al.*, 2013; Rodríguez *et al.*, 2015). En este contexto, de acuerdo a nuestros resultados en silenciamiento en adipocitos 3T3-L1, esta disminución en Rab34 podría acarrear deficiencias en la tasa de lipólisis/lipogénesis en los adipocitos (y preadipocitos), lo que está de acuerdo con estudios que indican que, en obesidad mórbida, se produce una reducción en la tasa metabólica del tejido adiposo (del Pozo *et al.*, 2011). No observamos variaciones entre obesos mórbidos con o sin resistencia a insulina, lo que indica que los cambios observados en Rab34 se asocian más al aumento de la acumulación de lípidos (hipertrofia de los adipocitos) que a la resistencia a insulina.

Sin embargo, nuestros modelos de hipertrofia y/o resistencia a insulina de adipocitos 3T3-L1 *in vitro*, no nos han resultado útiles para elucidar los procesos que podrían ser responsables de los cambios observados en el contenido de Rab34 en el tejido adiposo humano en obesidad, ya que en ningún caso redujeron el contenido de esta GTPasa, como observamos en grasa subcutánea de individuos obesos con o sin resistencia a insulina. Parece probable que, como en el caso de NECC2, los cambios observados en el tejido adiposo de individuos obesos sean el resultado de la suma o la interacción de los múltiples procesos de estrés celular que se activan en los adipocitos obesos. Queda por establecer si en el hígado de pacientes obesos, especialmente en aquellos que presentan esteatosis hepática (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) o su forma más extrema (*non-alcoholic steatohepatitis*, NASH), con acumulación de GLs en los hepatocitos, se producen variaciones en la distribución y/o el contenido de Rab34 y, en tal caso, como ocurre en el tejido adiposo en obesidad, si dichas variaciones son un efecto o la causa de la disfunción de los hepatocitos y adipocitos que ocurre en obesidad.





# CONCLUSIONES





## CONCLUSIONES

1. NECC2 es una proteína citosólica que es reclutada a la superficie celular de los adipocitos en respuesta a insulina, localizándose en la cara citosólica de las caveolas en estrecha relación con la actina cortical y el receptor de insulina.
2. NECC2 podría representar un componente de la red andamiaje de las caveolas, en las que actuaría modulando la señalización de insulina.
3. La expresión de NECC2 en el tejido adiposo aumenta en obesidad, especialmente en condiciones de insulino-resistencia, sugiriendo un papel adaptativo para esta proteína que, no obstante, no parece suficiente para mantener la respuesta normal de las células en condiciones de aumento de la adiposidad.
4. La GTPasa Rab34 presenta una distribución dual, en aparato de Golgi y gotas lipídicas, dependiente del estadio de desarrollo o del estado (pato) fisiológico de las células.
5. Rab34 es un marcador de la adquisición de un fenotipo acumulador de lípidos, tanto en condiciones fisiológicas (adipogénesis en adipocitos) como patológicas (exposición a ácidos grasos en hepatocitos).
6. Rab34 se asocia a las gotas lipídicas presumiblemente vía transporte retrógrado a través del compartimento intermedio retículo endoplásmico-Golgi (ERGIC), en un proceso en el que probablemente interviene el sistema Arf1/COPI.
7. Rab34 podría regular la biogénesis y el crecimiento de las gotas lipídicas controlando tanto el tráfico intracelular de lípidos como el transporte de estos orgánulos.
8. La obesidad altera la expresión de Rab34 en el tejido adiposo, probablemente como respuesta a los diferentes estímulos y procesos de estrés celular que ocurren en condiciones de exceso de adiposidad, lo que podría contribuir a la disfunción de los adipocitos.



# BIBLIOGRAFÍA



Aakula A, Kohonen P, Leivonen SK, Mäkelä R, Hintsanen P, Mpindi JP, Martens-Uzunova E, Aittokallio T, Jenster G, Perälä M, Kallioniemi O, Östling P. (2016). Systematic Identification of MicroRNAs That Impact on Proliferation of Prostate Cancer Cells and Display Changed Expression in Tumor Tissue. *Eur Urol*, 69, 1120-1128.

Aivazian D, Serrano RL, Pfeffer S. (2006). TIP47 is a key effector for Rab9 localization. *J Cell Biol*, 173, 917-926.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K y Walter P. (2002). Transport from the Trans Golgi Network to the Cell Exterior: Exocytosis. En *Molecular Biology of the Cell* (pág. Cap. 13). New York: Garland Science.

Albinsson S, Shakirova Y, Rippe A, Baumgarten M, Rosengren BI, Rippe C, Hallmann R, Hellstrand P, Rippe B y Sward K. (2007). Arterial remodeling and plasma volume expansion in caveolin-1-deficient mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 293(3), R1222-1231.

Ali BR, Wasmeier C, Lamoreux L, Strom M y Seabra MC. (2004). Multiple regions contribute to membrane targeting of Rab GTPases. *J. Cell Sci.*, 117, 6401-6412.

Alloatti A, Kotsias F, Pauwels AM, Carpier JM, Jouve M, Timmerman E, Pace L, Vargas P, Maurin M, Gehrman U, Joannas L, Vivar OI, Lennon-Duménil AM, Savina A, Gevaert K, Beyaert R, Hoffmann E y Amigorena S. (2015). Toll-like receptor 4 engagement on dendritic cells restrains phago-lysosome fusion and promotes cross-presentation of antigens. *Immunity.*, 43, 1087-1100.

Alory, C. y Balch W.E. (2001). "Organization of the Rab-GDI/CHM superfamily: the functional basis for choroideremia disease". *Traffic*. 2: 532-543.

Ameer F, Scanduzzi L, Hasnain S, Kalbacher H y Zaidi N. (2014). De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism*, 63, 895-902.

Angers CG y Merz AJ. (2011). New links between vesicle coats and Rab-mediated vesicle targeting. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, 22, 18-26.

Barbero P, Bittova L y Pfeffer SR. (2002). Visualization of Rab9-mediated vesicle transport from endosomes to the trans-Golgi in living cells. *J. Cell Biol.*, 156, 511-518.

Barbosa A, Savage D y Siniosoglou S. (2015). Lipid droplet organelle interactions: emerging roles in lipid metabolism. *Current Opinion in Cell Biology*, 35, 91-97.

Barneda D, Planas-Iglesias J, Gaspar ML, Mohammadyani D, Prasannan S, Dormann D, Han GS, Jesch SA, Carman GM, Kagan V, Parker MG, Ktistakis NT, Klein-Seetharaman J, Dixon AM, Henry SA y Christian M. (2015). The brown adipocyte protein CIDEA promotes lipid droplet fusion via a phosphatidic acid-binding amphipathic helix. *Elife*, 4, e07485.

Barr FA. (2009). Rab GTPase function in Golgi trafficking. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 20, 780-783.

- Barr FA. (2013). Rab GTPases and membrane identity: Causal or inconsequential? *J. Cell Biol.*, 202, 191-199.
- Barr F y Lambright DG. (2010). Rab GEFs and GAPs. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 22, 461-470.
- Bartz R, Li WH, Venables B, Zehmer JK, Roth MR, Welti R, Anderson RG, Liu P y Chapman KD. (2007). Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic. *J. Lipid. Res.*, 48, 837-847.
- Beck R, Rawet M, Wieland FT y Cassel D. (2009). The COPI system: molecular mechanism and function. *FEBS Lett.*, 583, 2701-2709.
- Beilstein F, Bouchoux J, Rousset M y Demignot S. (2013). Proteomic analysis of lipid droplets from Caco-2/TC7: Enterocytes identifies novel modulators of lipid secretion. *PLOS One.*, 8, e53017.
- Beller M, Sztalryd C, Southall N, Bell M, Jäckle H, Auld DS y Oliver B. (2008). COPI complex is a regulator of lipid homeostasis. *PLoS Biol.*, 6, e292.
- Beller M, Thiel K, Thul PJ y Jäckle H. (2010). Lipid droplets: A dynamic organelle moves into focus. *FEBS Letters.*, 584, 2176-2182.
- Bento CF, Puri C, Moreau K, y Rubinsztein D. (2013). The role of membrane-trafficking small GTPases in the regulation of autophagy. *J Cell Sci*, 126, 1059-1069.
- Berry R y Rodeheffer MS. (2013). Characterization of the adipocyte cellular lineage in vivo. *Nat. Cell Biol.*, 15, 302-308.
- Bevan, P. (2001). "Insulin signaling". *J. Cell Sci.* 114: 1429-1430.
- Bhuin T y Roy JK. (2014). Rab proteins: th key regulators of intracellular vesicle transport. *Exp. Cell Resp.*, 328, 1-19.
- Binns D, Januszewski T, Chen Y, Hill J, Markin VS, Zhao Y, Gilpin C, Chapman KD, Anderson RG y Goodman JM. (2006). An intimate collaboration between peroxisomes and lipid bodies. *J. Cell Biol.*, 173, 719-731.
- Bloor ID y Symonds ME. (2014). Sexual dimorphism in white and brown adipose tissue with obesity and inflammation. *Horm Behav*, 66(1), 95-103.
- Bonifacino JS. (2014). Vesicular transport earns a Nobel. *Trends in Cell Biology*, 24(1), 3-5.
- Blüher S, Molz E, Wiegand S, Otto KP, Sergeev E, Tuschy S, L'Allemand-Jander D, Kiess W y Holl RW. (2013). Body mass index, waist circumference, and waist-to-height ratio as predictors of cardiometabolic risk in childhood obesity depending on pubertal development. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 98, 3384-3393.
- Bonifacino J y Hierro A. (2011). Transport according to GARP: receiving retrograde cargo at the trans-Golgi network. *Trends Cell Biol.*, 21, 159-167.

Bouvet S, Golinelli-Cohen MP, Contremoulins V y Jackson CL. (2013). Targeting of the Arf-GEF GBF1 to lipid droplets and Golgi membranes. *J. Cell. Sci.* , 126, 4794-4805.

Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*, 72, 248-254.

Brasaemle DL, Dolios G, Shapiro L y Wang R. (2004). Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.*, 279, 46835-46842.

Brasaemle DL, Levin DM, Adler-Wailes DC y Londos C. (2000). The lipolytic stimulation of 3T3-L1 adipocytes promotes the translocation of hormone-sensitive lipase to the surfaces of lipid storage droplets. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1483, 251-262.

Brasaemle DL. (2007). Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J. Lipid Res.*, 48, 2547-2559.

Briand N, Dugail I y Le Lay S. (2011). "Cavin proteins: New players in the caveolae field.". *Biochimie*, 93(1), 71-77.

Bröcker C, Engelbrecht-Vandré S, Ungermann C. (2010). Multisubunit tethering complexes and their role in membrane fusion. *Curr. Biol.*, 20, R943-952.

Burcelin R. (2013). New insights into adipose cell biology. *Bull Acad Natl Med*, 197, 79-92.

Burén J, Liu HX, Lauritz J y Eriksson JW. (2003). High glucose and insulin in combination cause insulin receptor substrate-1 and -2 depletion and protein kinase B desensitisation in primary cultured rat adipocytes: possible implications for insulin resistance in type 2 diabetes. *Eur. J. Endocrinol.*, 148, 157-167.

Burguete AS, Fenn TD, Brunger AT y Pfeffer SR. (2008). Rab and Arl GTPase family members cooperate in the localization of the golgin GCC185. *Cell*, 132, 286-298.

Burkhard P, Stetefeld J y Strelkov SV. (2001). Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *11*, 82-88.

Cai H, Reinisch K y Ferro-Novick S. (2007). Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Dev Cell*, 12(5), 671-682.

Carpentier JL. (1993). Robert Feulgen Prize Lecture 1993. The journey of the insulin receptor into the cell: from cellular biology to pathophysiology. *Histochemistry*, 100, 169-184.

Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Rotellar F, Silva C, Gil MJ, Rodríguez A, Cienfuegos JA, Salvador J y Frühbeck G. (2007). The obestatin receptor (GPR39) is expressed in human



adipose tissue and is down-regulated in obesity-associated type 2 diabetes mellitus. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, 66, 598-601.

Cereijo R, Giralt M y Villarroya F. (2015). Thermogenic brown and beige/brite adipogenesis in humans. *Ann. Med.*, 47, 169-177.

Chaineau M, Ioannou MS, McPherson PS. (2013). Rab35: GEFs, GAPs and Effectors. *Traffic*, 14, 1109-1117.

Chakrabarti P, English T, Shi J, Smas CM y Kandror KV. (2010). Mammalian target of rapamycin complex 1 suppresses lipolysis, stimulates lipogenesis, and promotes fat storage. *Diabetes*, 59, 775-781.

Chen Y, Pan R y Pfeifer A. (2016). Fat tissues, the brite and the dark sides. *Pflugers Arch.*, 1-5.

Cheng JP y Nichols BJ. (2016). Caveolae: one function or many? *Trends Cell Biol.*, 26, 177-189.

Cheung PY y Pfeffer SR. (2016). Transport Vesicle Tethering at the Trans Golgi Network: Coiled Coil Proteins in Action. *Front. Cell Dev. Biol.*, 4, 18.

Cheung PY, Limouse C, Mabuchi H y Pfeffer SR. (2015). Protein flexibility is required for vesicle tethering at the Golgi. *Elife*, 4, e12790.

Christoloudides C, Lagathu C, Sethi JK y Vidal-Puig A. (2009). Adipogenesis and WNT signalling. *Trends Endocrinol. Metab*, 20, 16-24.

Cohen AW, Razani B, Schubert W, Williams TM, Wang XB, Iyengar P, Brasaemle DL, Scherer PE y Lisanti MP. (2004). Role of Caveolin-1 in the Modulation of Lipolysis and Lipid droplet formation. *Diabetes*, 53, 1261-1270.

Cohen C y Parry DA. (1990). Alpha-helical coiled coils and bundles: how to design an alpha-helical protein. *Proteins*, 7, 1-15.

Couve A, Restituto S, Brandon JM, Charles KJ, Bawagan H, Freeman KB, Pangalos MN, Calver AR y Moss SJ. (2004). Marlin-1, a novel RNA-binding protein associates with GABA receptors. *J. Biol. Chem.*, 279, 13934-13943.

Cristancho AG y Lazar MA. (2011). Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 12, 722-734.

Cruz-García D, Díaz-Ruiz A, Peinado JR, Rabanal-Ruiz Y, Gracia-Navarro F, Castaño JP, Montero-Hadjadje M, Tonon MC, Vaudry H, Anouar Y, Vázquez-Martínez R y Malagón MM. (2012). The Golgi-associated long coiled-coil protein NECC1 participates in the control of the regulated secretory pathway in PC12 cells. *Biochem. J.*, 443, 387-396.

Cruz-García D, Díaz-Ruiz A, Rabanal-Ruiz Y, Peinado JR, Gracia-Navarro F, Castaño JP, Montero-Hadjadje M, Tonon MC, Vaudry H, Anouar Y, Vázquez-Martínez R y Malagón MM. (2012). The Golgi-associated long coiled-coil protein NECC1 participates in the control of the regulated secretory pathway in PC12 cells. *Biochem. J.*, 443(2), 387-96.

- Cruz-García D, Vazquez-Martinez R, Peinado JR, Anouar Y, Tonon MC, Vaudry H, Castaño JP, Malagon MM. (2007). Identification and characterization of two novel (neuro)endocrine long coiled-coil proteins. *FEBS Lett.*, 581(17), 3149-3156.
- Czech MP, Tencerova M, Pedersen DJ y Aouadi M. (2013). Insulin signaling mechanisms for triacylglycerol storage. *Diabetologia*, 56, 949-964.
- Das M, Das S, Wang P, Powell SR y Das DK. (2008). Caveolin and proteasome in tocotrienol mediated myocardial protection. *Cell Physiol Biochem*, 22, 287–294.
- Del Pozo CH, Calvo RM, Vesperinas-García G, Gómez-Ambrosi J, Frühbeck G, Rubio MA y Obregon MJ. (2011). Expression profile in omental and subcutaneous adipose tissue from lean and obese subjects. Repression of lipolytic and lipogenic genes. *Obes. Surg.*, 633-643.
- Der P, Cui J y Das DK. (2006). Role of lipid rafts in ceramide and nitric oxide signaling in the ischemic and preconditioned hearts. *J Mol Cell Cardiol*, 40, 313–320.
- Delevoeye C y Goud B. (2015). Rab GTPases and kinesin motors in endosomal trafficking. *Methods. Cell Biol.*, 130, 235-246.
- Díaz-Ruiz A, Guzman-Ruiz R, Moreno NR, Garcia-Rios A, Delgado-Casado N, et al. (2015). Proteasome Dysfunction Associated to Oxidative Stress and Proteotoxicity in Adipocytes Compromises Insulin Sensitivity in Human Obesity. *Antioxid Redox Signal*(23), 597-612.
- Díaz-Ruiz A, Rabanal-Ruis Y, Trávez A, Gracia-Navarro F, Cruz-García D, Montero-Hadjadje M, Anouar Y, Gasman S, Vitale N, Vázquez-Martínez R, Malagón MM. (2013). The Long Coiled-Coil Protein NECC2 Is Associated to Caveolae and MODULATES NGF/TrkA Signaling IN PC12 CELLS. *PLoS ONE*, 8(9), e73668.
- Díaz-Ruiz JA. (2011). Caracterización celular y molecular de la proteína Neuroendocrine long coiled-coil 2 (NECC2). Tesis doctoral. Universidad de Córdoba.
- Diekmann Y, Seixas E, Gouw M, Tavares-Cadete F, Seabra MC, y Pereira-Leal JB. (2011). Thousands of rab GTPases for the cell biologist. *PLoS Comput. Biol*, 7, e1002217.
- Ding Y, Wu Y, Zeng R y Liao K. (2012). “Proteomic profiling of lipid droplet-associated proteins in primary adipocytes of normal and obese mouse”. *Acta. Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*., 44, 1-13.
- Ducharme NA y Bickel PE. (2008). Lipid droplets in lipogenesis and lipolysis. *Endocrinology*, 149, 942-949.
- Duncan RE, Ahmadian M, Jaworski K, Sarkadi-Nagy E y Sul HS. (2007). Regulation of Lipolysis in Adipocytes. *Annu. Rev. Nutr.*, 27, 79-101.
- Echarri A y Del Pozo MA. (2015). Caveolae - mechanosensitive membrane invaginations linked to actin filaments. *J. Cell Sci.*, 128, 2747-2758.
- Echarri A, Muriel O y Del Pozo MA. (2007). Intracellular trafficking of raft/caveolae domains: insights from integrin signaling. *Semin Cell Dev Biol*, 18(5), 627-637.

- Eddidin M. (2003). Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(5), 414-418.
- Egami Y. (2016). Molecular imaging analysis of Rab GTPases in the regulation of phagocytosis and macropinocytosis. *Anat Sci Int*, 91, 35-42.
- Eehalt R, Fullekrug J, Pohl J, Ring A, Herrmann T y Stremmel W. (2006). Translocation of long chain fatty acids across the plasma membrane--lipid rafts and fatty acid transport proteins. *Mol. Cell. Biochem.*, 284, 135-140.
- Ellis JM, Frahm JL, Li LO y Coleman RA. (2010). Acyl-coenzyme A synthetases in metabolic control. *Curr. Opin. Lipidol.* , 21, 212-217.
- Ellong EN, Soni KG, Bui QT, Sougrat R, Golinelli-Cohen MP y Jackson CL. (2011). Interaction between the triglyceride lipase ATGL and the Arf1 activator GBF1. *PLoS One*, 6, e21889.
- Engelman JA, Chu C, Lin A, Jo H, Ikezu T, Okamoto T, Kohtz DS y Lisanti MP. (1998). Caveolin-mediated regulation of signaling along the p42/44 MAP kinase cascade in vivo. A role for the caveolin-scaffolding domain. *FEBS Lett.*, 428, 205-211.
- Fagerholm S, Ortegren U, Karlsson M, Ruishalme I y Strålfors P. (2009). Rapid insulin-dependent endocytosis of the insulin receptor by caveolae in primary adipocytes. *PLoS One*, 4, e5985.
- Fain JN, Cheema PS, Bahouth SW, Lloyd Hiler M. (2003). Resistin release by human adipose tissue explants in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun*, 300, 674-678.
- Farazi TA, Waksman G y Gordon JI. (2001). The biology and enzymology of protein N-myristoylation. *J. Biol. Chem.*, 276, 39501-39504.
- Fève B. (2005). Adipogenesis: cellular and molecular aspects. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, 19, 483-499.
- Foti M, Porcheron G, Fournier M, Maeder c, Carpentier JL. (2007). The neck of caveolae is a distinct plasma membrane subdomain that concentrates insulin receptors in 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*(104), 1242-1247.
- Fra AM, Williamson E, Simons K y Parton RG. (1995). De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92(19), 8655-8659.
- Franckhauser S, Munoz S, Pujol A, Casellas A, Riu E, Otaegui P, Su B y Bosch F. (2002). Increased fatty acid re-esterification by PEPCCK overexpression in adipose tissue leads to obesity without insulin resistance. *Diabetes*, 51, 624-630.
- Frayn KN, Karpe F, Fielding BA, Macdonald IA y Coppack SW. (2003). Integrative physiology of human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 27, 875-888.

- Fredrikson G, Tornqvist H y Belfrage P. (1986). Hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase are both required for complete degradation of adipocyte triacylglycerol. *Biochim. Biophys. Acta.*, 876, 288-93.
- Fröjdö S, Vidal H y Pirola L. (2009). Alterations of insulin signaling in type 2 diabetes: a review of the current evidence from humans. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1792, 83-92.
- Fröjdö S, Vidal H y Pirola L. (2009). Alterations of insulin signaling in type 2 diabetes: a review of the current evidence from humans. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1792, 83-92.
- Fruhbeck, G. and Gomez-Ambrosi, J. (2005). Adipose tissue en Encyclopedia of Human Nutrition (Second Edition), (eds Caballero, B., Allen, L., Prentice, A.; Elsevier Ltd) pp 1-14
- Frühbeck G, López M y Diéguez C. (2007). Role of caveolins in body weight and insulin resistance regulation. *Trends Endocrinol Metab.*, 18, 177-182.
- Frühbeck G, Méndez-Giménez L, Fernández-Formoso JA, Fernández S y Rodríguez A. (2014). Regulation of adipocyte lipolysis. *Nutr Res Rev.*, 27, 63-93.
- Fujimoto T y Parton RG. (2011). Not just fat: the structure and function of the lipid droplet. *Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol.*, 3, a004838.
- Fujimoto T, Ohsaki Y, Cheng J, Suzuki M y Shinohara Y. (2008). Lipid droplets: a classic organelle with new outfits. *Histochem. Cell Biol.*, 130, 263-279.
- Fukuda M. (2008). Regulation of secretory vesicle traffic by Rab small GTPases. *Cell Mol. Life Sci.*, 65, 2801-2813.
- Fukuda M. (2011). TBC proteins: GAPs for mammalian small GTPase Rab? *Biosci Rep.*, 31, 159-168.
- Galea G, Bexiga MG, Panarella A, O'Neill ED, Simpson JC. (2015). A high-content screening microscopy approach to dissect the role of Rab proteins in Golgi-to-ER retrograde trafficking. *J. Cell Biol.*, 128, 2339-2349.
- Galic S, Oakhill JS y Steinberg GR. (2010). Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol. Cell Endocrinol.*, 316, 129-139.
- Gambin Y, Ariotti N, McMahon KA, Bastiani M, Sierrecki E, Kovtun O, Polinkovsky ME, Magenau A, Jung W, Okano S, Zhou Y, Leneva N, Mureev S, Johnston W, Gaus K, Hancock JF, Collins BM, Alexandrov K y Parton RG. (2013). Single-molecule analysis reveals self assembly and nanoscale segregation of two distinct cavin subcomplexes on caveolae. *Elofe*, 3, e01434.
- Gao Q y Goodman JM. (2015). The lipid droplet-a well-connected organelle. *Front. Cell Dev. Biol.*, 3(49), 1-12.
- Gillingham AK y Munro S. (2003). Long coiled-coil proteins and membrane traffic. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1641(2-3), 71-85.
- Gillingham Ak y Munro S. (2016). Finding the Golgi: Golgin Coiled-Coil Proteins Show the Way. *Trends. Cell Biol.*, 26, 399-408.

- Goldenberg NM, Grinstein S, y Silverman M. (2007). Golgi-bound Rab34 is a novel member of the secretory pathway. *Mol. Biol. Cell*, 18, 4762-4771.
- Goldenberg NM y Silverman M. (2009). Rab34 and its effector munc13-2 constitute a new pathway modulating protein secretion in the cellular response to hyperglycemia. *Am J Physiol Cell Physiol*, 297, 1053-1058.
- Goodman JM. (2008). The gregarious lipid droplet. *J. Biol. Chem.*, 283, 28005-28009.
- Goud B y Gleeson PA. (2010). TGN golgins, Rabs and cytoskeleton: regulating the Golgi trafficking highways. *Trends Cell Biol*, 20(6), 329-336.
- Grahn TH, Kaur R, Yin J, Schweiger M, Sharma VM, Lee MJ, Ido Y, Smas CM, Zechner R, Lass A y Puri V. (2014). Fat-specific protein 27 (FSP27) interacts with adipose triglyceride lipase (ATGL) to regulate lipolysis and insulin sensitivity in human adipocytes. *J. Biol. Chem.*, 289, 12029-12039.
- Granneman JG, Moore HP, Granneman RL, Greenberg AS, Obin MS y Zhu Z. (2007). *Biol. Chem.*, 5726-5735.
- Grosshans, B.L., Ortiz, D. y Novick, P. (2006). "Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 103: 11821-11827.
- Guilherme, A., Virbasius, J. V., Puri, V. and Czech, M. P. (2008). Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 367-377.
- Guo W, Sacher M, Barrowman J, Ferro-Novick S y Novick P. (2000). Protein complexes in transport vesicle targeting. *Trends. Cell Biol.* , 10(6), 251-255.
- Guo Y, Walther TC, Rao M, Stuurman N, Goshima G, Terayama K, Wong JS, Vale RD, Walter P y Farese RV. (2008). Functional genomic screen reveals genes involved in lipid droplet formation and utilization. *Nature*, 453, 657-661.
- Gustavsson J, Parpal S, Karlsson M, Ramsing C, Thorn H, et al. (1999). Localization of the insulin receptor in caveolae of adipocytes plasma membrane. *FASEB, J*(13), 1961-1971.
- Gutiérrez MG, Mishra BB, Jordao L, Elliott E, Anes E, Griffiths G. (2008). NF-kappa B activation controls phagolysosome fusion-mediated killing of mycobacteria by macrophages. *J Immunol*, 181(4), 2651-63.
- Guzmán-Ruiz R, Ortega F, Rodríguez A, Vázquez-Martínez R, Díaz-Ruiz A, García-Navarro S, Giralt M, García-Ríos A, Cobo-Padilla D, Tinahones FJ, López-Miranda J, Villarroya F, Frühbeck G, Fernández-Real JM, Malagón MM. (2014). Alarmin high-mobility group B1 (HMGB1) is regulated in human adipocytes in insulin resistance and influences insulin secretion in  $\beta$ -cells. *Int. J. Obes. (Lond)*. , 38, 1545-1554.
- Hamdy O, Porramatikul S, Al-Ozairi, E. (2006). Metabolic obesity: the paradox between visceral and subcutaneous fat. *Curr Diabetes Rev*, 2, 367-373.

- Hammer JA 3rd y Wu XS. (2002). Rabs grab motors: defining the connections between Rab GTPases and motor proteins. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 14, 69-75.
- Han B, Copeland CA, Tiwari A y Kenworthy AK. (2016). Assembly and Turnover of Caveolae: What Do We Really Know? *Front. Cell Dev. Biol.*, 4, 68.
- Hansen CG y Nichols BJ. (2010). Exploring the caves: cavins, caveolins and caveolae. *Trends Cell Biol*, 20(4), 177-186.
- Hansen CG, Shvets E, Howard G, Riento K, y Nichols BJ. (2013). Deletion of cavin genes reveals tissue-specific mechanisms for morphogenesis of endothelial caveolae. *Nat. Commun.*, 4, 1831.
- Hanson RW y Reshef L. (2033). Glyceroneogenesis revisited. *Biochimie*, 85(12), 1199-1205.
- Harman-Boehm I, Bluher M, Redel H, Sion-Vardy N, Ovadia S, Avinoach E, Shai I, Kloting N, Stumvoll M, Bashan N, Rudich A. (2007). Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity. *J Clin Endocrinol Metab*, 92, 2240-2247.
- Hashemi HF y Goodman JM. (2015). The life cycle of lipid droplets. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 33, 119-124.
- Hayer A, Stoeber M, Bissig C y Helenius A. (2010). Biogenesis of caveolae: stepwise assembly of large caveolin and cavin complexes. *Traffic*, 11, 361–382.
- Hayes GL Brown FC, Haas AK, Nottingham RM, Barr FA y Pfeffer SR. (2009). Multiple Rab GTPase binding sites in GCC185 suggest a model for vesicle tethering at the trans-Golgi. *Mol. Biol. Cell.*, 20, 209-217.
- He HJ, Kole S, Kwon YK, Crow MT y Bernier M. (2003). Interaction of filamin A with the insulin receptor alters insulin-dependent activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.*, 278, 27096-27104.
- Head BP, Patel HH y Insel PA. (2014). Interaction of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton: impact on signaling and function: membrane/lipid rafts, mediators of cytoskeletal arrangement and cell signaling. *Biochim. Biophys. Acta*, 1838, 532-545.
- Heffernan LF y Simpson JC. (2014). The trials and tubule-ations of Rab6 involvement in Golgi-to-ER retrograde transport. *Biochem Soc Trans.*, 42, 1453-1459.
- Helms JB y Zurzolo C. (2004). Lipids as targeting signals: lipid rafts and intracellular trafficking. *Traffic*, 5, 247-254.
- Herms A, Bosch M, Reddy B, Schieber NL, Fajardo A, Rupérez C, Fernández-Vidal A, Ferguson C, Rentero C, Tebar F, Enrich C, Parton RG, Gross SP y Pol A. (2015). AMPK activation promotes lipid droplet dispersion on detyrosinated microtubules to increase mitochondrial fatty acid oxidation. 6, 7176.

- Hesse D, Jaschke A, Chung B y Schürmann A. (2013). Trans-Golgi proteins participate in the control of lipid droplet and chylomicron formation. *Biosci. Rep.*, 33, 1-9.
- Hida Y y Ohtsuka T. (2010). CAST and ELKS proteins: structural and functional determinants of the presynaptic active zone. *J. Biochem*, 148(2), 131-137.
- Hodges RS. (1996). Boehringer Mannheim award lecture 1995. La conferencia Boehringer Mannheim 1995. De novo design of alpha-helical proteins: basic research to medical applications. *Biochem. Cell Biol.*, 74(2), 133-154.
- Hodges BD y Wu CC. (2010). Proteomic insights into an expanded cellular role for cytoplasmic lipid droplets. *J. Lipid Res.*, 51, 262-273.
- Hong W y Lev S. (2014). Tethering the assembly of SNARE complexes. *Trends Cell Biol.*, 24, 35-43.
- Horgan CP y McCaffrey MW. (2011). Rab GTPases and microtubule motors. *Biochem. Soc. Trans.*, 39, 1202-1206.
- Hresko RC y Mueckler M. (2005). mTOR-RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.*, 280, 40406-40416.
- Huang J y Manning BD. (2009). A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. *Biochem. Soc. Trans.*, 37, 217-222.
- Huang J, Imamura T y Olefsky JM. (2001). Insulin can regulate GLUT4 internalization by signaling to Rab5 and the motor protein dynein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 98, 13084-13089.
- Hunt MC, Siponen MI y Alexson SEH. (2012). The emerging of acyl-CoA thioesterases and acyltransferases in regulating peroxisomal lipid metabolism". *Biochim. Biophys. Acta.*, 1822, 1397-1410.
- Ishida M, Oguchi ME, y Fukuda M. (2016). Multiple Types of Guanine Nucleotide Exchange Factors (GEFs) for Rab Small GTPases. *Cell Struct. Funct.*, 41, 61-79.
- Jacquier N, Choudhary V, Mari M, Toulmay A, Reggiori F y Schneiter R. (2011). Lipid droplets are functionally connected to the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.*, 124, 2424-2437.
- Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Duncan RE, Ahmadian M y Sul HS. (2007). Regulation of triglyceride metabolism. IV. Hormonal regulation of lipolysis in adipose tissue. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.*, 293, G1-4.
- Jia B, Madsen L, Petersen RK, Techer N, Kopperud R, Ma T, Døskeland SO, Ailhaud G, Wang J, Amri EZ y Kristiansen K. (2012). Activation of protein kinase A and exchange protein directly activated by cAMP promotes adipocyte differentiation of human mesenchymal stem cells. *PLoS One*, 7, e34114.
- Jordens I, Fernandez-Borja M, Marsman M, Dusseljee S, Janssen L, Calafat J, Janssen H, Wubbolts R y Neefjes J. (2001). The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal

transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors. *Curr. Biol.*, 11, 1680-1685.

Kabayama K, Sato T, Saito K, Loberto N, Prinetti A, Sonnino S, Kinjo M, Igarashi Y y Inokuchi J. (2007). Dissociation of the insulin receptor and caveolin-1 complex by ganglioside GM3 in the state of insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104, 13678-13683.

Kahn BB y Flier JS. (2000). Obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.*, 106, 473-481.

Kalhan SC, Bugianesi E, McCullough AJ, Hanson RW y Kelley DE. (2008). Estimates of hepatic glyceroneogenesis in type 2 diabetes mellitus in humans. *Metabolism*, 57, 305-312.

Kanzaki M y Pessin JE. (2002). Caveolin-associated filamentous actin (Cav-actin) defines a novel F-actin structure in adipocytes. *J. Biol. Chem.*, 277, 25867-25869.

Kanzaki M. (2006). Insulin receptor signals regulating GLUT4 translocation and actin dynamics. *Endocr J*(53), 267-293.

Karlsson M, Thorn H, Danielsson A, Stenkula KG, Ost A, Gustavsson J, Nystrom FH y Strålfors P. (2004). Colocalization of insulin receptor and insulin receptor substrate-1 to caveolae in primary human adipocytes. Cholesterol depletion blocks insulin signalling for metabolic and mitogenic control. *Eur. J. Biochem.*, 271, 2471-2479.

Kasmapour B, Gronow A, Bleck CK, Hong W, Gutiérrez MG. (2012). Size-dependent mechanism of cargo sorting during lysosome-phagosome fusion is controlled by Rab34. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109(50), 20485-20490.

Kassan A, Herms A, Fernández-Vidal A, Bosch M, Schieber NL, Reddy BJN, Fajardo A, Gelabert-Baldrich M, Tebar F, Enrich C, Gross SP, Parton RG y Pol A. (2013). Acyl-CoA synthetase 3 promotes lipid droplet biogenesis in ER microdomains. *J. Cell Biol.*, 203, 985-1001.

Kelley DE, Thaete FL, Troost F, Huwe T, Goodpaster BH. (2000). Subdivisions of subcutaneous abdominal adipose tissue and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 278, e941-948.

Kim JJ, Lipatova Z, Majumdar U y Segev N. (2016). Regulation of Golgi Cisternal Progression by Ypt/Rab GTPases. *Dev. Cell.*, 36, 440-452.

Kimmel AR y Sztalryd C. (2016). The Perilipins: Major Cytosolic Lipid Droplet-Associated Proteins and Their Roles in Cellular Lipid Storage, Mobilization, and Systemic Homeostasis. *Annu. Rev. Nutr.*, 36, 471-509.

Kimmel AR, Brasaemle DL, McAndrews-Hill M, Sztalryd C y Londos C. (2010). Adoption of PERILIPIN as a unifying nomenclature for the mammalian PAT-family of intracellular lipid storage droplet proteins. *J. Lipid Res.*, 51, 468-471.



- Kirkham M y Parton RG. (2005). Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. *Biochim Biophys Acta*, 1746(3), 349-63.
- Kirkham M, Nixon SJ, Howes MT, Abi-Rached L, Wakeham DE, Hanzal-Bayer M, Ferguson C, Hill MM, Fernandez-Rojo M, Brown DA, Hancock JF, Brodsky FM y Parton RG. (2008). Evolutionary analysis and molecular dissection of caveola biogenesis." *J Cell Sci*, 121(Pt 12), 2075-2086.
- Kohlwein SD, Veenhuis M y van der Klei IJ. (2013). Lipid Droplets and Peroxisomes: Key Players in Cellular Lipid Homeostasis or A Matter of Fat-Store 'em Up or Burn 'em Down. *Genetics*, 193(1), 1-50.
- Konige M, Wang H y Sztalryd C. (2014). Role of adipose specific lipid droplet proteins in maintaining whole body energy homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1842, 393-401.
- Kory N, Farese Jr. R y Walther T. (2016). Targeting Fat: Mechanisms of protein localization to lipid droplets. *Trends Cell Biol.*, 26(7), 535-346.
- Kovtun O, Tillu VA, Ariotti N, Parton RG y Collins BM. (2015). Cavin family proteins and the assembly of caveolae. *J. Cell Sci.*, 128, 1269-1278.
- Krahmer N, Fares, RV Jr. y Walther TC. (2013). Balancing the fat: lipid droplets and human disease. *EMBO Mol. Med.*, 5, 905-915.
- Krahmer N, Guo Y, Wilfling F, Hilger M, Lingrell S, Heger K, Newman HW, Schmidt-Supprian M, Vance DE, Mann M, Farese RV Jr. y Walther TC. (2011). Phosphatidylcholine synthesis for lipid droplet expansion is mediated by localized activation of CTP: Phosphocholine Cytidylyltransferase. *Cell. Metab.*, 14, 504-515.
- Kuerschner L, Moessinger C y Thiele C. (2008). Imaging of lipid biosynthesis: how a neutral lipid enters lipid droplets. *Traffic*, 9, 338-352.
- Kühnlein RP. (2011 ). The contribution of the Drosophila model to lipid droplet research. *Prog. Lipid. Res.*, 50, 348-356.
- Kwon H y Pessin JE. (2013). Adipokines mediate inflammation and insulin resistance. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, 4(71).
- Kwon H y Pak Y. (2009). Prolonged tyrosine kinase activation of insulin receptor by pY27-caveolin-2. *Biochem Biophys Res Commun*, 391(1), 49-55.
- Kwon H, Jeong K y Pak Y. (2009). Identification of pY19-caveolin-2 as a positive regulator of insulin-stimulated actin cytoskeleton-dependent mitogenesis. *J Cell Mol Med*, 13(8A), 1549-1564.
- Lafontan M y Langin D. (2009). Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog. Lipid Res.*, 48, 275-297.
- Lafontas M. (2008). Advances in adipose tissue metabolism. *Int. J. Obes. (Lond).*, 7, S39-51.

- Lajoie P y Nabi IR. (2007). "Regulation of raft-dependent endocytosis." *J Cell Mol Med*, 11(4), 644-653.
- Lajoie P y Nabi IR. (2010). Lipid rafts, caveolae, and their endocytosis. *Int Rev Cell Mol Biol*, 282, 135-163.
- Lamaze C y Torrino S. (2015). Caveolae and Cancer: A New Mechanical Perspective. *Biomed J*, 38, 367-379).
- Lau SY, Taneja AK y Hodges RS. (1984). Synthesis of a model protein of defined secondary and quaternary structure. Effect of chain length on the stabilization and formation of two-stranded alpha-helical coiled-coils. *J. Biol. Chem.*, 259(21), 13253-13261.
- Le Lay S y Kurzchalia TV. (2005). Getting rid of caveolins: phenotypes of caveolin-deficient animals. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1746(3), 322-333.
- Lee MT, Mishra A y Lambright DG. (2009). Structural mechanisms for regulation of membrane traffic by rab GTPases. *Traffic*. 2009, 10, 1377-1389.
- Lefterova MI y Lazar MA. (2009). New developments in adipogenesis. *Trends Endocrinol. Metab*, 20, 107-114.
- Lefterova MI, Zhang Y, Steger DJ, Schupp M, Schug J, Cristancho A, Feng D, Zhuo D, Stoeckert CJ Jr, Liu XS y Lazar MA. (2008). PPARgamma and C/EBP factors orchestrate adipocyte biology via adjacent binding on a genome-wide scale. *Genes Dev.* , 22, 2941-2952.
- Leung KF, Baron R, Ali BR, Magee AI y Seabra MC. (2007). Rab GTPases containing a CAAX Motif are processed post-geranylgeranylation by proteolysis and methylation. *J.Biol. Chem.*, 282, 1487-1497.
- Levental I y Veatch SL. (2016). The Continuing Mystery of Lipid Rafts. *J. Mol. Biol.* 16, 30341-30342.
- Li G y Marlin MC. (2015). Rab family of GTPases. *Methods Mol. Biol.*, 1298, 1-15.
- Li Q, Wang J, Wan Y y Chen D. (2016). Depletion of Rab32 decreases intracellular lipid accumulation and induces lipolysis through enhancing ATGL expression in hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun.*, 471, 492-496.
- Lingwood D y Simons K. (2010). Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*, 327(5961), 46-50.
- Liu J y Rost B. (2001). Comparing function and structure between entire proteomes. *Protein Sci.*, 10(10), 1970-1979.
- Liu J, Zheng Q, Deng Y, Cheng CS, Kallenbach NR y Lu M. (2006). A seven-helix coiled coil. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 103(42), 15457-15462.

- Liu P, Bartz R, Zehmer JK, Ying, YS, Zhu M, Serrero G y Anderson RG. (2007). Rab-regulated interaction of early endosomes with lipid droplets. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1773, 784-793.
- Liu S y Storrie B. (2015). How do Rab proteins determine Golgi structures. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, 315, 1-22.
- Lodhi IJ y Semenkovich CF. (2014). Peroxisomes: a nexus for lipid metabolism and cellular signaling. *Cell Metab.* , 19, 380-392.
- Lodhi IJ, Wei X y Semenkovich CF. (2011). Lipoexpediency: de novo lipogenesis as a metabolic signal transmitter. *Trends Endocrinol Metab.* , 22, 1-8.
- Lorent JH y Levental I. (2015). Structural determinants of protein partitioning into ordered membrane domains and lipid rafts. *Chem. Phys. lipids*, 192, 23-32.
- Lowe M. (2011). Structural organization of the Golgi apparatus. *Curr. Opin. Cell Biol.* , 23, 85-93.
- Lupas A. (1996). Predicting coiled coils from protein sequences. *Science*, 252(5009), 1162-1164.
- Malagón MM, Díaz-Ruiz A, Guzmán-Ruiz R, Jiménez-Gómez Y, Moreno NR, García-Navarro S, Vázquez-Martínez R, Peinado JR. (2013). Adipobiology for Novel Therapeutic Approaches in Metabolic Syndrome. *Curr asc Pharmacology*, 11, 954-967.
- Malashkevich VN, Kammerer RA, Efimov VP, Schulthess T Y Engel J. (1996). The crystal structure of a five-stranded coiled coil in COMP: a prototype ion channel? *Science*, 274(5288), 761-765.
- Manning BD y Cantley LC. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, 129, 1261-1274.
- Mariman ECM, Wang P. (2010). Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity. *Cell. Mol. Life Sci.*, 67(8), 1277-1292.
- Martin S, Driessen K, Nixon SJ, Zerial M y Parton RG. (2005). Regulated localization of Rab18 to lipid droplets: Effects of lipolytic stimulation and inhibition of lipid droplet catabolism. *J. Biol. Chem.*, 280, 42325-42335.
- Mason JM y Arndt KM. (2004). Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications. *Chembiochem.*, 5(2), 170-176.
- McDonough PM, Ingermanson RS, Loy PA, Koon ED, Whittaker R, Laris CA, Jeffrey M. Hilton, James B. Nicoll, Benjamin M. Buehrer y Price JH. (2011). Quantification of Hormone Sensitive Lipase Phosphorylation and Colocalization with Lipid Droplets in Murine 3T3L1 and Human Subcutaneous Adipocytes via Automated Digital Microscopy and High-Content Analysis. *Assay Drug. Dev. Technol.*, 9, 262-280.

McMahon KA, Zajicek H, Li WP, Peyton MJ, Minna JD, Hernandez VJ, Luby-Phelps K y Anderson RG. (2009). SRBC/cavin-3 is a caveolin adapter protein that regulates caveolae function. *Embo J*, 28(8), 1001-1015.

Méndez-Giménez L, Rodríguez A, Balaquer I y Frühbeck G. (2014). Role of aquaglyceroporins and caveolins in energy and metabolic homeostasis. *Mol. Cell Endocrinol.*, 397, 78-92.

Mineo C, Ying YS, Chapline C, Jaken S y Anderson RG. (1998). Targeting of protein kinase Alpha to caveolae. *J Cell Biol*, 141(3), 601-610.

Miserey-Lenkei S, Chalancon G, Bardin S, Formstecher E, Goud B y Echard A. (2010). Rab and actomyosin-dependent fission of transport vesicles at the Golgi complex. *Nat. Cell Biol.*, 12, 645-654.

Mishra S, Khaddaj R, Cottier S, Stradalova V, Jacob C, Schneiter R. (2016 ). Mature lipid droplets are accessible to ER luminal proteins. *J Cell Sci.* , jcs.189191.

Mizuno-Yamasaki E, Rivera-Molina F y Novick P. (2012). GTPase networks in membrane traffic. *Annu Rev Biochem.* 2012;81:637-59., 81, 637-659.

Monier S, Parton RG, Vogel F, Behlke J, Henske A y Kurzchalia TV. (1995). VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro. *Mol Biol Cell*, 6(7), 911-927.

Moreno-Castellanos N, Guzmán-Ruiz R, Cano DA, Madrazo-Atutxa A, Peinado JR, Pereira-Cunill JL, García-Luna PP, Morales-Conde S, Socas-Macias M, Vázquez-Martínez R, Leal-Cerro A y Malagón MM. (2016a). The Effects of Bariatric Surgery-Induced Weight Loss on Adipose Tissue in Morbidly Obese Women Depends on the Initial Metabolic Status. *Obes. Surg.*, 26, 1757-1767.

Moreno-Castellanos N, Rodríguez A, Rabanal-Ruiz Y, Fernández-Vega A, López-Miranda J, Frühbeck G y Malagón MM. (2016b). The cytoskeletal protein septin 11 is associated with human obesity and is involved in adipocyte lipid storage and metabolism. *Diabetologia*, en prensa.

Moro C, Galitzky J, Sengenès C, Crampes F, Lafontan M y Berlan M. (2004). Functional and pharmacological characterization of the natriuretic peptide-dependent lipolytic pathway in human fat cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 308(3), 984-992.

Mostowy S y Cossart P. (2012). Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 183-194.

Mundy DI, Machleidt T, Ying YS, Anderson RG y Bloom GS. (2002). Dual control of caveolar membrane traffic by microtubules and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci*, 115(Pt 22), 4327-4339.

Munro S. (2003). Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell*, 115(4), 377-388.

Murphy DJ. (2001). the biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog. Lipid Res.*, 40, 325-438.

Murphy S, Martin S y Parton RG. (2009). Lipid droplet-organelle interactions; sharing the fats. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1791, 441-447.

Murshid A y Presley JF. (2004). ER-to-Golgi transport and cytoskeletal interactions in animal cells. *Cell Mol. Life Sci.*, 61, 133-145.

Na H, Zhang P, Ding Y, Yang L, Wang Y, Zhang H, Xie Z, Yang F, Cichello S y Liu P. (2013). Proteomic studies of isolated lipid droplets from bacteria, *C. elegans*, and mammals. *Methods Cell Biol.*, 116, 1-14.

Nagayama M, Uchida T y Gohara K. (2007). Temporal and spatial variations of lipid droplets during adipocyte division and differentiation. *J. Lipid Res.*, 48, 9-18.

Nagoshi T, Matsui T, Aoyama T, Leri A, Anversa P, Li L, Ogawa W, del Monte F, Gwathmey JK, Grazette L, Hemmings BA, Kass DA, Champion HC y Rosenzweig A. (2005). PI3K rescues the detrimental effects of chronic Akt activation in the heart during ischemia/reperfusion injury. *J. Clin. Invest.*, 115, 2128-2138.

Nakamura N, Akashi T, Taneda T, Kogo H, Kikuchi A y Fujimoto T. (2004). ADRP is dissociated from lipid droplets by ARF1-dependent mechanism. *Biochem. Biophys Res Commun*, 322(3), 957-965.

Nassar ZD y Parat MO. (2015). Cavin Family: New Players in the Biology of Caveolae. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, 235-305.

Nielsen R, Pedersen TA, Hagenbeek D, Moulos P, Siersbaek R, Megens E, Denissov S, Børgesen M, Francoijs KJ, Mandrup S, Stunnenberg HG. (2008). Genome-wide profiling of PPARgamma:RXR and RNA polymerase II occupancy reveals temporal activation of distinct metabolic pathways and changes in RXR dimer composition during adipogenesis. *Genes Dev.*, 22, 2953-2967.

Nielsen TS, Jessen N, Jørgensen JO, Møller N y Lund S. (2014). Dissecting adipose tissue lipolysis: molecular regulation and implications for metabolic disease. *J. Mol. Endocrinol.*, 52, R199-222.

Ntambi JM y Young-Cheul K. (2000). Adipocyte differentiation and gene expression. *J. Nutr.*, 130, 3122S-3126S.

Ogata T, Naito D, Nakanishi N, Hayashi YK, Taniguchi T, Miyagawa K, Hamaoka T, Maruyama N, Matoba S, Ikeda K, Yamada H, Oh H y Ueyama T. (2014). MURC/Cavin-4 facilitates recruitment of ERK to caveolae and concentric cardiac hypertrophy induced by  $\alpha$ 1-adrenergic receptors. *Proc. Natl. Sci. U.S.A.*, 111, 3811-3816.

Okamoto T, Schlegel A, Scherer PE y Lisanti MP. (1998). Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J. Biol. Chem.*, 273, 5419-5422.

- Olofsson SO, B. P. (2008). Triglyceride containing lipid droplets and lipid droplet-associated proteins. *Curr. Opin. Lipidol.*, 19, 441-447.
- O'Rourke RW, Metcalf MD, White AE, Madala A, Winters BR, Maizlin II, Jobe BA, Roberts CT Jr, Slifka MK, Marks DL. (2009). Depot-specific differences in inflammatory mediators and a role for NK cells and IFN-gamma in inflammation in human adipose tissue. *Int J Obes (Lond)*, 33, 978-990.
- Ortegren U, Karlsson M, Blazic N, Blomqvist M, Nystrom FH, Gustavsson J, Fredman P y Stralfors P. (2004). Lipids and glycosphingolipids in caveolae and surrounding plasma membrane of primary rat adipocytes. *Eur J Biochem*, 271(10), 2028-2036.
- Ostermeyer AG, Paci JM, Zeng Y, Lublin DM, Munro S y Brown DA . (2001). Accumulation of caveolin in the endoplasmic reticulum redirects the protein to lipid storage droplets. *J Cell Biol.* 152:1071-1078., 152, 1071-1078.
- Otto TC, Lane MD. (2005). Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 40, 229-242.
- Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ y Walsh K. (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 11, 85-97.
- Owen OE, Kalhan SC y Hanson RW. (2002). The key role of Anaplerosis and Cataplerosis for citric acid cycle function. *J. Biol. Chem.*, 277, 30409-304012.
- Ozeki S, Cheng J, Tauchi-Sato K, Hatano N, Taniguchi H y Fujimoto T. (2005). Rab18 localizes to lipid droplets and induces their close apposition to the endoplasmic reticulum-derived membrane. *J. Cell Sci.*, 118, 2601-2611.
- Ozes ON, Akca H, Mayo LD, Gustin JA, Maehama T, Dixon JE y Donner DB. (2001). A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR pathway mediates and PTEN antagonizes tumor necrosis factor inhibition of insulin signaling through insulin receptor substrate-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98, 4640-4645.
- Pagac M, Cooper DE, Qi Y, Lukmantara IE, Mak HY, Wu Z, Tian Y, Liu Z, Lei M, Du X, Ferguson C, Kotevski D, Sadowski P, Chen W, Boroda S, Harris TE, Liu G, Parton RG, Huang X, Coleman RA y Yang H. (2016). SEIPIN Regulates Lipid Droplet Expansion and Adipocyte Development by Modulating the Activity of Glycerol-3-phosphate Acyltransferase. *Cell Resp.*, 17, 1546-1559.
- Parat MO. (2009). The biology of caveolae: achievements and perspectives. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, 273, 117-162.
- Parpal S, Karlsson M, Thorn H y Strålfors P. (2001). Cholesterol depletion disrupts caveolae and insulin receptor signaling for metabolic control via insulin receptor substrate-1, but not for mitogen-activated protein kinase control. *J. Biol. Chem.*, 276, 9670-9678.
- Parton RG y Simons K. (2007). The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(3), 185-194.

- Parton RG, y del Pozo MA. (2013). Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*, 14, 98–112.
- Peiro S, Comella JX, Enrich C, Martin-Zanca D, Rocamora N. (2000). PC12 cells have caveolae that contain TrkA. Caveolae-disrupting drugs inhibit nerve growth factor-induced, but not epidermal growth factor-induced, MAPK phosphorylation. *J Biol Chem*(275), 37846-37852.
- Pelkmans L. (2005). Secrets of caveolae- and lipid raft-mediated endocytosis revealed by mammalian viruses. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1746(3), 295-304.
- Pellegrinelli V, Carobbio S y Vidal-Puig A. (2016). Adipose tissue plasticity: how fat depots respond differently to pathophysiological cues. *Diabetologia.*, 59, 1075-1088.
- Penno A, Hackenbroich G y Thiele C. (2013). Phospholipids and lipid droplets. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1831, 589-594.
- Pessin JE y Saltiel AR. (2000). Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J. Clin. Invest.*, 106, 165-169.
- Pfeffer SR y Aivazian D. (2004). Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 5, 886-896.
- Pfeffer SR. (2005). Filling the Rab GAP. *Nat. Cell Biol.*, 7, 856-857.
- Pfeffer SR. (2013). Rab GTPase regulation of membrane identity. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 25, 414-419.
- Pilch PF y Liu L. (2011). Fat caves: caveolae, lipid trafficking and lipid metabolism in adipocytes. *Trends Endocrinol. Metab.*, 22, 318-324.
- Pilch PF, Suoto RP, Liu L, Jedrychowski MP, Berg EA, Costello CE y Gygi SP. (2007). Cellular spelunking: exploring adipocyte caveolae. *J. Lipid Res.*, 48, 2103-2111.
- Ploegh H. (2007). A lipid-based model for the creation of an escape hatch from the endoplasmic reticulum. *Nature*, 448, 435-438.
- Pol A, Martin S, Fernandez MA, Ferguson C, Carozzi A, Luetterforst R, Enrich C y Parton RG. (2004). Dynamic and regulated association of caveolin with lipid bodies: modulation of lipid body motility and function by a dominant negative mutant. *Mol Biol Cell*.
- Pol A, Martin S, Fernandez MA, Ingelmo-Torres M, Ferguson C, Enrich C y Parton RG. (2005). Cholesterol and fatty acids regulate dynamic caveolin trafficking through the Golgi complex and between the cell surface and lipid bodies. *Mol Biol Cell*, 16(4), 2091-2105.
- Pomorski T, Hrafnsdottir S, Devaux PF y van Meer G. (2001). Lipid distribution and transport across cellular membranes. *Semin Cell Dev Biol*, 12(2), 139-148.
- Pulido MR, Diaz-Ruiz A, Jiménez-Gómez Y, Garcia-Navarro S, Gracia-Navarro F, Tinahones F, López-Miranda J, Frühbeck G, Vázquez-Martínez R y Malagón MM. (2011).

- Rab18 dynamics in adipocytes in relation to lipogenesis, lipolysis and obesity. *PLoS One*, 6, e22931.
- Rabanal-Ruiz Y. (2014). Regulación de las gotas lipídicas en adipocitos: papel de Rab18 y caracterización de sus interactoma. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba.
- Rambold AS, Cohen S y Lippincott-Schwartz J. (2015). Rambold AS1, Cohen S1, Lippincott-Schwartz J. *Dev. Cell*, 32, 678-692.
- Razani B, y Lisanti MP. (2001). Caveolin-deficient mice: insights into caveolar function human disease. *J. Clin. Invest.*, 108, 1553–1561.
- Reshef L, Olswang Y, Cassuto H, Blum B, Croniger CM, Kalhan SC, Tilghman SM y Hanson RW. (2003). Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. *J. Biol. Chem.*, 278, 30413-30416.
- Reue K. (2011). Lipid droplet storage and metabolism: from yeast to man. *J. Lipid Res.*, 52, 1865-1868.
- Richter T, Floetenmeyer M, Ferguson C, Galea J, Goh J, Lindsay MR, Morgan GP, Marsh BJ y Parton RG. (2008). High-resolution 3D quantitative analysis of caveolar ultrastructure and caveola-cytoskeleton interactions. *Traffic*, 9, 893-909.
- Ritcher T, Floetenmeyer M, Ferguson C, Galea J, Goh J, Lindsay MR, Morgan GP, Marsh BJ y Parton RG. (2007). High-resolution 3D quantitative analysis of caveolar ultrastructure and caveola-cytoskeleton interactions. *Traffic*, 9, 893-909.
- Rodbell M. (1964). Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J. Biol. Chem.*, 239, 375-380.
- Rodríguez A, Ezquerro S, Méndez-Giménez L, Becerril S, y Frühbeck G. (2015). Revisiting the adipocyte: a model for integration of cytokine signaling in the regulation of energy metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 309, e691-714.
- Rodríguez A, Gómez-Ambrosi J, Catalán V, Becerril S, Sáinz N, Gil MJ, Silva C, Salvador J, Barba J, Colina I, Frühbeck G. (2010). Association of plasma acylated ghrelin with blood pressure and left ventricular mass in patients with metabolic syndrome. *J Hypertens*, 28(3), 560-567.
- Root KT, Plucinsky SM y Glover KJ. (2015). Recent progress in the topology, structure, and oligomerization of caveolin: a building block of caveolae. *Curr. Top. Membr.*, 75, 305–336.
- Rose A y Meier I. (2004). Scaffolds, levers, rods and springs: diverse cellular functions of long coiled-coil proteins. *Cell Mol. Life. Sci.*, 61(16), 1996-2009.
- Rosen ED y MacDougald OA. (2006). Adipocyte differentiation the inside out. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol*, 7, 885-896.



- Roux KJ, Kim DI, Raida M, Burke B. (2012). A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J Cell Biol*, 196(6), 801-810.
- Rowe DC, McGettrick AF, Latz E, Monks BG, Gay NJ, Yamamoto M, Akira S, O'Neill LA, Fitzgerald KA y Golenbock DT. (2006). The myristoylation of TRIF-related adaptor molecule is essential for Toll-like receptor 4 signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103, 6299-6304.
- Rutkowski JM, Stern JH y Scherer PE. (2015). The cell biology of fat expansion. *J. Cell Biol.*, 208, 501-512.
- Saben J, Thakali KM, Lindsey FE, Zhong Y, Badger TM, Andres A y Shankar K. (2014). Distinct adipogenic differentiation phenotypes of human umbilical cord mesenchymal cells dependent on adipogenic conditions. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, 239, 1340-1351.
- Saltiel AR y Kahn CR. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414, 799-806.
- Sano H, Eguez L, Teruel MN, Fukuda M, Chuang TD, Chavez JA, Lienhard GE y McGraw TE . (2007). Rab10, a target of the AS160 Rab GAP, is required for insulin-stimulated translocation of GLUT4 to the adipocyte plasma membrane. *Cell Metab*, 5, 293-303.
- Saponaro C, Gaggini M, Carli F y Gastaldelli A. (2015). The Subtle Balance between Lipolysis and Lipogenesis: A Critical Point in Metabolic Homeostasis. *Nutrients*, 7(11), 9453-9474.
- Scheiffele P, Verkade P, Fra AM, Virta H, Simons K e Ikonen E. (1998). Caveolin-1 and -2 in the exocytic pathway of MDCK cells. *J Cell Biol*, 140(4), 795-806.
- Scherer PE, Lewis RY, Volonte D, Engelman JA, Galbiati F, Couet J, Kohtz DS, van Donselaar E, Peters P y Lisanti MP. (1997). Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo. *J Biol Chem*, 272(46), 29337-29346.
- Schnitzer JE, Allard J y Oh P. (1995). NEM inhibits transcytosis, endocytosis, and capillary permeability: implication of caveolar fusion in endothelia. *Am. J. Physiol.*, 268, H48-55.
- Schoch S y Gundelfinger ED. (2006). Molecular organization of the presynaptic active zone. *Cell Tissue Res.*, 326(2), 379-791.
- Schrader M y Yoon Y. (2007). Mitochondria and peroxisomes: are the 'big brother' and the 'little sister' closer than assumed? *Bioessays.*, 29, 1105-1114.
- Schwartz SL, Cao C, Pylypenko O, Rak A, y Wandinger-Ness A. (2008). Rab GTPases at a glance. *J. Cell Sci.*, 121, 246.
- Seto S, Tsujimura K, Koide Y. (2011). Rab GTPases regulating phagosome maturation are differentially recruited to mycobacterial phagosomes. *Traffic*, 12(4), 407-420.

- Shajahan AN, Wang A, Decker M, Minshall RD, Liu MC y Clarke R. (2007). Caveolin-1 tyrosine phosphorylation enhances paclitaxel-mediated cytotoxicity. *J. Biol. Chem.*, 282(8), 5934-5943.
- Shi H, Seeley RJ, Clegg DJ. (2009). Sexual differences in the control energy homeostasis. *Neuroendocrinol*, 30, 394-404.
- Shigematsu S, Watson RT, Khan AH y Pessin JE. (2003). The adipocyte plasma membrane caveolin functional/structural organization is necessary for the efficient endocytosis of GLUT4. *J. Biol. Chem.*, 278, 10683-10690.
- Shvets E, Bitsikas V, Howard G, Hansen CG y Nichols BJ. (2015). Dynamic caveolae exclude bulk membrane proteins and are required for sorting of excess glycosphingolipids. *Nat. Commun.*, 6, 6867.
- Shvets E, Ludwing A y Nichols BJ. (2014). News from the caves: update on the structure and function of caveolae. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 29, 99-106.
- Simons K y Gerl MJ. (2010). Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(10), 688-699.
- Simons K y Toomre D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1(1), 31-39.
- Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, Sessa WC, Engelman JA, Scherer PE, Okamoto T y Lisanti MP. (1999). Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol. Cell Biol.*, 19, 7289-7304.
- Smart EJ, Ying Y, Donzell WC y Anderson RG. (1996). A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J. Biol. Chem.*, 271(46), :29427-19435.
- Smith AJ, Thompson BR, Sanders MA y Bernlohr DA . (2007). Interaction of the adipocyte fatty acid-binding protein with the hormone-sensitive lipase: regulation by fatty acids and phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 282, 32424-32432.
- Smith U. (2015). Abdominal obesity: a marker of ectopic fat accumulation. *J. Clin. Invest.*, 125, 1790-1792.
- Snijder MB, D. J. (2003). Associations of hip and thigh circumferences independent of waist circumferences with the incidence of type 2 diabetes: the Hoorn Study. *Am J Clin Nutr*, 77, 1192-1197.
- Soni KG, Mardones GA, Sougart R, Smirnova E, Jackson CL y Bonifacino JS. (2009). Coatamer-dependent protein delivery to lipid droplets. *J. Cell Sci.*, 122, 1834-1841.
- Sönnichsen B, De Renzis S, Nielsen E, Rietdorf J y Zerial M. (2000). Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J. Cell Biol.*, 149, 901-914.

- Sonnino S, Aureli M, Grassi S, Mauri L, Prioni S y Prinetti A. (2014). Lipid rafts in neurodegeneration and neuroprotection. *Mol. Neurobiol.*, 50, 130-148.
- Sorci-Thomas MG y Thomas MJ. (2016). Microdomains, Inflammation, and Atherosclerosis. *Circ. Res.*, 118, 679-691.
- Sowa G, Pypaert M, Fulton D y Sessa WC. (2003). The phosphorylation of caveolin-2 on serines 23 and 36 modulates caveolin-1-dependent caveolae formation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(11), 6511-6516.
- Sowa G, Xie L, Xu L y Sessa WC. (2008). Serine 23 and 36 phosphorylation of caveolin-2 is differentially regulated by targeting to lipid raft/caveolae and in mitotic endothelial cells". *Biochemistry*, 47(1), 101-111.
- Stan V. (2002). Structure and function of endothelial caveolae. *Microsc. Res. Tech.*, 57(5), 350-364.
- Starling GP, Yip YY, Sanger A, Morton PE, Eden ER y Dodding MP. (2016). Folliculin directs the formation of a Rab34-RILP complex to control the nutrient-dependent dynamic distribution of lysosomes. *EMBO Rep.*, 17, 823-841.
- Staubach S y Hanisch FG. (2011). Lipid rafts: signaling and sorting platforms of cells and their roles in cancer. *Expert. Rev. Proteomics*, 8, 263-277.
- Steindler C, Li Z, Algarte M, Alcover A, Libri V, Ragimbeau J y Pellegrini S. (2004). Jamip1 (marlin-1) defines a family of proteins interacting with janus kinases and microtubules. *J. Biol. Chem.*, 279(41), 43168-43177.
- Stenkula KG, Thorn H, Franck N, Hallin E, Sauma L, Nystrom FH y Strålfors P. (2007). Human, but not rat, IRS1 targets to the plasma membrane in both human and rat adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 363, 840-845.
- Stenmark H, Parton RG, Steele-Mortimer O y Lütcke A. (1994). "Inhibition of Rab5 GTPase activity simulates membrane fusion in endocytosis". *EMBO. J.*, 13, 1287-1296.
- Stenmark H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 10, 513-525.
- Stetefeld J, Jenny M, Schulthess T, Landwehr R, Engel J y Kammerer RA. (2000). Crystal structure of a naturally occurring parallel right-handed coiled coil tetramer. *Nat. Struct. Biol.*, 7(9), 772-776.
- Stone SJ, Levin MC, Zhou P, Han J, Walther TC y Farese RV Jr. (2009). The endoplasmic reticulum enzyme DGAT2 is found in mitochondria-associated membranes and has a mitochondrial targeting signal that promotes its association with mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 284, 5352-5361.
- Sun P, Yamamoto H, Suetsugu S, Miki H, Takenawa T y Endo T. (2003). Small GTPase Rah/Rab34 is associated with membrane ruffles and macropinosomes and promotes macropinosome formation. *J Biol Chem*, 278(6), :4063-71.

- Sun Z, Gong J, Wu L y Li P. (2013). Imaging lipid droplet fusion and growth. *Methods Cell Biol.*, 116, 253-268.
- Sundaramoorthy V, Sultana JM y Atkin JD. (2015). Golgi fragmentation in amyotrophic lateral sclerosis, an overview of possible triggers and consequences. *Front. Neurosci.*, 27, 400.
- Sverdlov, M., V. Shinin, A. T. Place, M. Castellon and R. D. Minshall. (2009). Filamin A regulates caveolae internalization and trafficking in endothelial cells. *Mol. Biol. Cell*, 20(21), 4531-4540.
- Swanson JA. (2008). Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9, 639-649.
- Sztalryd C y Kimmel AR. (2014). Perilipins: lipid droplet coat proteins adapted for tissue-specific energy storage and utilization, and lipid cytoprotection. *Biochimie.*, 96, 96-101.
- Tan SX, Ng Y, Burchfield JG, Ramm G, Lambright DG, Stöckli J y James DE. (2012). The Rab GTPase-activating protein TBC1D4/AS160 contains an atypical phosphotyrosine-binding domain that interacts with plasma membrane phospholipids to facilitate GLUT4 trafficking in adipocytes. *Mol. Cell Biol.*, 32, 4946-4959.
- Tarnopolsky MA, Rennie CD, Robertshaw HA, Fedak-Tarnopolsky SN, Devries MC y Hamadeh MJ. (2007). Influence of endurance exercise training and sex on lipid and mitochondrial ultrastructure, substrate use, and mitochondria enzyme activity. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 292, R1271-1278.
- Tchkonia T, Thomou T, Zhu Y, Karagiannides I, Pothoulakis C, Jensen MD, Kirkland JL. (2013). Mechanisms and metabolic implications of regional differences among fat depots. *Cell Metab*, 5, 644-656.
- Thiam AR, Farese RV Jr y Walther TC. (2013). The biophysics and cell biology of lipid droplets. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 14, 775-786.
- Thomas CM y Smart EJ. (2008). Caveolae structure and function. *J Cell Mol Med*, 12(3), 796-809.
- Thompson BR, Lobo S y Bernlohr DA. (2010). Fatty acid flux in adipocytes: the in's and out's of fat cell lipid trafficking. *Mol. Cell Endocrinol*, 318, 24-33.
- Thorn H, Stenkula KG, Karlsson M, Ortegren U, Nystrom FH, Gustavsson J y Stralfors P. (2003). Cell surface orifices of caveolae and localization of caveolin to the necks of caveolae in adipocytes. *Mol. Biol. Cell*, 14, 3967-3976.
- Trayhurn P. (2013). Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity. *Physiol. Rev.*, 93, 1-21.
- van Roermund CW, Tabak HF, van Den Berg M, Wanders RJ y Hetteema EH. (2000). Pex11p plays a primary role in medium-chain fatty acid oxidation, a process that affects peroxisome number and size in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.*, 150, 489-498.

- van Vliet, C., E. C. Thomas, A. Merino-Trigo, R. D. Teasdale and P. A. Gleeson. (2003). Intracellular sorting and transport of proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 83(1), 1-45.
- Varshney P, Yadav V y Saini N. (2016). Lipid rafts in immune signalling: current progress and future perspective. *Immunology*, 149, 13-24.
- Vázquez-Martínez R, Díaz-Ruiz A, Almabouada F, Rabanal-Ruiz Y, Gracia-Navarro F y Malagón MM. (2012). Revisiting the regulated secretory pathway: from frogs to human. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 175, 1-9.
- Vázquez-Vela ME, Torres N. y Tovar AR. (2008). White Adipose Tissue as Endocrine Organ and Its Role in Obesity. *Arcives of Medical Research*, 39, 715-728.
- Vidal RL, Ramirez OA, Sandoval L, Koenig-Robert R, Hartel S y Couve A. (2007). Marlin-1 and conventional kinesin link GABAB receptors to the cytoskeleton and regulate receptor transport. *Mol. Cell Neurosci.*, 35(3), 501-512.
- Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Wesrergren R, Niemi T, Tauttonen M, Laine J, Savisto NJ, Enerback S, Nuutila P. (2009). Functional Brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl H Med*, 360, 1518-1525.
- Virtue, S. y Vidal-Puig, A. (2010). "Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome: an allostatic perspective". *Biochim. Biophys. Acta.* 1801: 338-349.
- Vock R, Weibel ER, Hoppeler H, Ordway G, Weber JM y Taylor CR. (1996). Design of the oxygen and substrate pathways. V. Structural basis of vascular substrate supply to muscle cells. *J. Exp. Biol.*, 199, 1675-1688.
- Vohl MC, Sladek R, Robitaille J, Gurd S, Marceau P, Richard D, Hudson TJ, Tchernof A. (2004). A survey of genes differentially expressed in subcutaneous and visceral adipose tissue in men. *Obes Res*, 12, 1217-1222.
- Vonderheit A, y Helenius A. (2005). Rab7 associates with early endosomes to mediate sorting and transport of Semliki forest virus to late endosomes. *PLoS Biol.*, 3, e233.
- Wajchenberg BL, Giannella-Neto D, da Silva ME, Santos RF. (2002). Depot-specific hormonal characteristics of subcutaneous and visceral adipose tissue and their relation to the metabolic syndrome. *Horm Metab Res*, 34(11-12), 616-621.
- Wajchenberg BL. (2000). Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev*, 21, 697-738.
- Walther TC y Farece RV Jr. (2012). Lipid droplets and cellular lipid metabolism. *Annu. Rev. Biochem.*, 81, 687-714.
- Wanders RJ, Visser WF, van Roermund CW, Kemp S y Waterham HR. (2007). The peroxisomal ABC transporter family. *Pflugers Arch.*, 453, 719-734.
- Wang H, Becuwe M, Housden BE, Chitraju C, Porras AJ, Graham MM, Liu XN, Thiam AR, Savage DB, Agarwal AK, Garg A, Olarte MJ, Lin Q, Fröhlich F, Hannibal-Bach HK,

- Upadhyayula S, Perrimon N, Kirchhausen T, Ejsing CS, Walther TC y Farese RV. (2016). Seipin is required for converting nascent to mature lipid droplets. *Elife*, 5, e16582.
- Wang H, Sreenevasan U, Hu H, Saladino A, Polster BM, Lund LM, Gong DW, Stanley W y Sztalryd C. (2011). Perilipin 5, a lipid droplet-associated protein, provides physical and metabolic linkage to mitochondria. *J. Lipid Res.*, 52, 2159-2168.
- Wang HJ, Gao Y, Chen L, Li YL y Jiang CL. (2015). RAB34 was a progression- and prognosis-associated biomarker in gliomas. *Tumour Biol.*, 36(3), 1573-1578.
- Wang T y Hong W. (2002). Interorganellar regulation of lysosome positioning by the Golgi apparatus through Rab34 interaction with Rab-interacting lysosomal protein. *Mol. Biol. Cell.*, 13(12)(12), 4317-4332.
- White MF. (2003). Insulin signaling in health and disease. *Science*, 302, 1710-1711.
- White UA y Stephens JM. (2009). Transcriptional factors that promote formation of white adipose tissue. *Mol. Cell. Endocrinol*, 318, 10-14.
- Witkos TM y Lowe M. (2016). The Golgin Family of Coiled-Coil Tethering Proteins. *Front. Cell Dev. Biol.*, 3, 86.
- Whyte JR y Munro S. (2002). Vesicle tethering complexes in membrane traffic. *J. Cell Sci.*, 115(Pt 13), 2627-2637.
- Wickner W y Schekman R. (2008). Membrane fusion. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 15, 658-664.
- Wilfling F, Thiam AR, Olarte MJ, Wang J, Beck R, Gould TJ, Allgeyer ES, Pincet F, Bewersdorf J, Farese RV Jr. y Walther TC. (2014). Arf1/COPI machinery acts directly on lipid droplets and enables their connection to the ER for p. *Elife*, 3, e01607.
- Williams D, Hicks SW, Machamer CE y Pessin JE. (2007). Golgin-160 is required for the Golgi membrane sorting of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 in adipocytes. *Mol. Biol. Cell*, 17, 5346-5355.
- Williams TM y Lisanti MP. (2004). The Caveolin genes: from cell biology to medicine. *Ann. Med.*, 36(8), 584-595.
- Wolins, N.E., Quaynor, B.K., Skinner, J.R., Schoenfish, M.J., Tzekov, A. y Bickel, P.E. (2005). "S3-12, Adipophilin, and TIP47 package lipid in adipocytes". *J. Biol. Chem.* 280: 19146-19155.
- Wolins NE, Brasaemle DL, Bickel PE. (2006). A proposed model of fat packaging by exchangeable lipid droplet proteins. *FEBS Lett*(580), 5484-5491.
- Woolfson DN, Bartlett GJ, Bruning M y Thomson AR. (2012). New currency for old rope: from coiled-coil assemblies to  $\alpha$ -helical barrels. *Curr. Opin. Struct. Biol.* , 22, 432-441.
- Wu J, Boström P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, Khandekar M, Virtanen KA, Nuutila P, Schaart G, Huang K, Tu H, van Marken Lichtenbelt WD, Hoeks J, Enerbäck S,

- Schrauwen P y Spiegelman BM. (2012). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*, 150, 366-376.
- Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, McKeon C, Darlington GJ, Spiegelman BM. (1999). Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell*, 3, 151-158.
- Wunderlich C, Schober k, Lange SA, Drab M, Braun-Dullaeus RC, Kasper M, Schwencke C, Schmeisser A y Strasser RH. (2006). Disruption of caveolin-1 leads to enhanced nitrosative stress and severe systolic and diastolic heart failure. *Biochem. Bioph. Res. Commun.*, 340(2), 702-708.
- Yamaguchi T, Omatsu N, Morimoto E, Nakashima H, Ueno K, Tanaka T, Satouchi K, Hirose F y Osumi T. (2007). CGI-58 facilitates lipolysis on lipid droplets but is not involved in the vesiculation of lipid droplets caused by hormonal stimulation. *J. Lipid Resp.*, 48, 1078-1089.
- Yamamoto M, Toya Y, Schwencke C, Lisanti MP, Myers MG Jr y Ishikawa Y. (1998). Caveolin is an activator of insulin receptor signaling. *J. Biol. Chem*, 273, 26962-26968.
- Yang L, Ding Y, Chen Y, Zhang S, Huo C, Wang Y, Yu J, Zhang P, Na H, Zhang H, Ma Y y Liu P. (2012). The proteomics of lipid droplets: structure, dynamics, and functions of the organelle conserved from bacteria to humans. *J. Lipid Resp.*, 53, 1245-1253.
- Yang Y, Ma Z, Hu W, Wang D, Jiang S, Fan C, Di S, Liu D, Sun Y y Yi W. (2016). Caveolin-1/-3: therapeutic targets for myocardial ischemia/reperfusion injury. *Basic Res Cardiol*, 111(4), 45
- Yeop Han C, Kargi AY, Omer M, Chan CK, Wabitsch M, O'Brien KD, Wight TN y Chait A. (2010). Differential effect of saturated and unsaturated free fatty acids on the generation of monocyte adhesion and chemotactic factors by adipocytes: dissociation of adipocyte hypertrophy from inflammation. *Diabetes*, 59, 386-396.
- Yu YB. (2002). Coiled-coils: stability, specificity, and drug delivery potential. *Adv Drug Deliv Rev.*, 54(8), 1113-1129.
- Yuan T, Hong S, Yao Y y Liao K. (2007). Glut-4 is translocated to both caveolae and non-caveolar lipid rafts, but is partially internalized through caveolae in insulin-stimulated adipocytes. *Cell Res.*, 17, 772-782.
- Zehmer JK, Huang Y, Peng G, Pu J, Anderson RG y Liu P. (2009). A role for lipid droplets in inter-membrane lipid traffic. *Proteomics*, 9, 914-921.
- Zhang J, Zhang X, Liu G, Chang D, Liang X, Zhu X, Tao W y Mei L. (2016). Intracellular Trafficking Network of Protein Nanocapsules: Endocytosis, Exocytosis and Autophagy. *Theranostics.*, 6(12), 2099-2113.
- Zhen Y, y Stenmark H. (2015). Cellular functions of Rab GTPases at a glance. *J. Cell Sci*, 128, 3171-3176.

Zheng YZ y Foster LJ. (2009). Biochemical and proteomic approaches for the study of membrane microdomains. *J Proteomics*, 72(1), 12-22.