

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA

Programa de Doctorado en Biomedicina



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Caracterización de las conexiones intracelulares que definen la expansión disfuncional del tejido adiposo en obesidad

*Characterization of the intracellular connections
defining adipose tissue dysfunctional expansion in
obesity*

Directoras: Prof. Dra. María del Mar Malagón Poyato y

Dra. Ana Gordon Bermúdez-Coronel

Jaime David López Alcalá

Córdoba, 2023

TITULO: *CARACTERIZACIÓN DE LAS CONEXIONES INTRACELULARES
QUE DEFINEN LA EXPANSIÓN DISFUNCIONAL DEL TEJIDO
ADIPOSO EN OBESIDAD*

AUTOR: *Jaime David López Alcalá*

© Edita: UCOPress. 2024
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>
ucopress@uco.es

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA

Programa de Doctorado en Biomedicina



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Caracterización de las conexiones intracelulares que definen la expansión disfuncional del tejido adiposo en obesidad

Memoria de Tesis Doctoral presentada por Jaime David López Alcalá,
Graduado en Bioquímica y Máster en Investigación Biomédica Traslacional,
para optar al grado de Doctor en Biomedicina

Las Directoras,

Prof. Dra. María del Mar Malagón Poyato

Catedrática de Biología Celular
de la Universidad de Córdoba

Dra. Ana Gordon Bermúdez-Coronel

Investigadora Postdoctoral
de la Universidad de Córdoba

En Córdoba, a 28 de diciembre 2023



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA



IMIBIC
INSTITUTO MAIMÓNIDES DE
INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
DE CÓRDOBA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA

Dra. María del Mar Malagón Poyato (Catedrática de Biología Celular) y Dra. Ana Gordon Bermúdez-Coronel (Investigadora Postdoctoral), ambas pertenecientes al Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba,

INFORMAN

Que D. Jaime David López Alcalá, Graduado en Bioquímica y Máster en Investigación Biomédica Traslacional, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo titulado **“Caracterización de las conexiones intracelulares que definen la expansión disfuncional del tejido adiposo en obesidad”** y que, bajo nuestro juicio, reúne los méritos suficientes para optar al Grado de Doctor en Biomedicina.

Y para que conste, firmamos el presente documento en Córdoba, 28 de diciembre de 2023.

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

Fdo.: Dra. Ana Gordon Bermúdez-Coronel



TÍTULO DE LA TESIS: Caracterización de las conexiones intracelulares que definen la expansión disfuncional del tejido adiposo en obesidad

DOCTORANDO: Jaime David López Alcalá

INFORME RAZONADO DE LAS DIRECTORAS DE LA TESIS

Durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, periodo comprendido entre febrero de 2017 y diciembre de 2022, el doctorando, Jaime David López Alcalá, no sólo ha superado con creces los objetivos planteados al comienzo de la misma, sino que ha desarrollado y validado técnicas experimentales novedosas, que le han permitido caracterizar los contactos entre orgánulos membranosos de los adipocitos y el impacto sobre los mismos de los procesos patogénicos asociados a obesidad y resistencia a insulina. Fruto de este trabajo, el doctorando ha publicado con primera autoría un trabajo directamente relacionado con su Tesis Doctoral en la revista “International Journal of Molecular Sciences”, otro que está en segunda revisión y primera autoría en el “Journal of Biomedical Science” y cuenta además con otros 5 artículos publicados y relacionados con la fisiopatología del tejido adiposo en obesidad, en los que comparte coautoría con otros miembros del grupo de investigación. Además, el doctorando ha presentado sus resultados en diferentes congresos de ámbito nacional (20 comunicaciones, 10 orales y 10 tipo póster) e internacional (1 comunicación tipo póster), de los cuales dos obtuvieron premio a la mejor comunicación (1 oral y 1 tipo póster), ha asistido a 9 cursos de formación (6 nacionales y 3 internacionales) y ha realizado 7 actividades docentes (entre ellas se encuentran 174 horas de docencia en asignaturas del Grado de Biología y Bioquímica de la Universidad de Córdoba y la supervisión de 3 Trabajos de Fin de Grado y 2 Trabajos de Fin de Máster). También ha realizado una estancia predoctoral internacional en el Laboratorio del Dr. Fajas (Universidad de Lausana) y que fue financiada por la *EMBO Fellowship Programme*, lo que le permitiría la obtención de la Mención de Doctorado Internacional.

Por todo ello, consideramos que el trabajo realizado por Jaime David López Alcalá cubre todos los criterios de calidad requeridos y, por ello, se autoriza la presentación de la Tesis Doctoral.

Córdoba, 28 de diciembre de 2023

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

Fdo.: **Dra. Ana Gordon Bermúdez Coronel**

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba y en el Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), bajo la dirección de la Prof. Dra. María del Mar Malagón Poyato y la Dra. Ana Gordon Bermúdez-Coronel. Dicho trabajo ha sido subvencionado mediante los proyectos del Ministerio de Asuntos Económicos y Transformación Digital (MINECO)/FEDER (BFU2016-76711-R and PID2019-108403RB-I00), y fondos propios del grupo de investigación. Durante el transcurso de la presente Tesis Doctoral se ha realizado una estancia de tres meses (desde el 15 de septiembre de 2020 hasta el 14 de diciembre de 2020) en el Centro de Genómica Integrativa, Edificio Génopode, Universidad de Lausana (Suiza) bajo la supervisión del Dr. Lluís Fajás Coll, financiada por: i) una ayuda para la realización de estancias en otros centros de I+D para beneficiarios FPI de la convocatoria 2017, dentro del Subprograma Estatal de Formación de Ayudas para Contratos Predoctorales para la Formación de Doctores (FPI17/BES-2017-081354), para la realización de estancias destinadas a la obtención de la Mención Internacional en el Título de Doctor; ii) una beca para estancias de corta duración de la Organización Europea de Biología Molecular (EMBO #8855).

A María del Mar Malagón y Ana Gordon, por su gran dedicación en la dirección de este trabajo, así como su preocupación por motivarme e integrarme en el campo de la investigación. Han sido muchas horas de discusión y debate científico que han permitido que mi esfuerzo se convierta en una superación día tras día, y en el perfeccionamiento de mi mejor versión como investigador.

A Rocío Guzmán y Rafael Manuel Vázquez, por tutorizar mi proyecto en esos momentos en los que los resultados se frenaban. Las cosas no siempre salen como uno espera y cuando parece que ya lo has intentado todo y que chocas con la pared necesitas a alguien que te haga virar o interpretar los resultados con otros ojos. Vosotros habéis sido ese alguien.

A Marco Antonio Calzado y Alejandro Correa por su ayuda decisiva en el gran artículo de esta Tesis Doctoral.

A Andrés Trávez de quien aprendí casi todo lo que sé. Por su paciencia infinita y la constante disponibilidad que tuvo para apoyarme en el desarrollo del TFG, TFM y unas prácticas de verano inolvidables. Todo ese trabajo fue el cimiento para que me haya convertido en lo que hoy soy.

A mis alumnos y compañeros de grupo, los antiguos y los nuevos. Todos me habéis ayudado multitud de veces en lo laboral y en lo personal, y habéis fomentado un clima de compañerismo y buen humor año tras año.

A todos los compañeros y amigos que pasasteis por el despacho, por criticar con buenos ojos mi trabajo cuando os pedía un consejo. Tener una visión ajena es necesario, sobre todo cuando viene desde un área del conocimiento diferente.

A mi jefe y mis compañeros de estancia, me hicieron la vida más fácil en otro país. Llevándome de puerta a puerta, y trayéndome la comida a casa durante un duro confinamiento. Con ellos conocí nuevas técnicas y aprendí que desde el laboratorio el cáncer no pinta tan mal.

A mi familia, a mis amigos y a Pilar, nunca dejaron de apoyarme, nunca dejaron que me rindiese y me animaron incansablemente hasta llegar al día de hoy. Nunca estaré suficientemente agradecido y espero poder recompensar el tiempo que no os dediqué por ocuparme de estos menesteres.

Abreviaturas

2D	2 Dimensiones
3D	3 Dimensiones
ACC	Acetil-CoA carboxilasa
ACS	Acil-CoA sintetasas
AGPAT	sn-1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferasa
AGPS	Alquilglicerona fosfato sintetasa
ALT	Alanina aminotransferasa
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
ARF	<i>ADP ribosylation factor</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ASP	<i>Acylation stimulating protein</i>
AST	Aspartato aminotransferasa
ATGL	<i>Adipose triglyceride lipase</i>
ATP	Adenosín trifosfato
BFA	Brefeldina A
BioID	Identificación de biotina dependiente de proximidad
C/EBP	<i>CCAAT/enhancer-binding protein</i>
CGI58	<i>Comparative gene identification-58</i>
CIDE	<i>Cell death-inducing DFFA-like effector</i>
CLAP	<i>Chymostatin-leupeptin-antipain-pepstatin</i>
CoA	coenzima A
co-IP	Co-inmunoprecipitación
COL-I	Colágeno tipo I
D0-10	Día 0-10
DAPI	<i>6-diamidino-2-phenylindole</i>
DAG	Diacilglicerol
DGAT	Diacilglicerol aciltransferasa
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DTT	Ditiotreitol
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERES	<i>Endoplasmic reticulum exit sites</i>
ERGIC	<i>Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment</i>
ERGIC53	<i>Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment 53 kDa protein</i>

ERO	Especie reactiva de oxígeno
FABP	<i>Fatty acid binding protein</i>
FAT	<i>Fatty acid translocase</i>
FATP	<i>Fatty acid transport protein</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FDR	<i>False discovery rate</i>
FEV	Fracción del estroma vascular
FIPs	<i>Rab11-Family of Interacting Proteins</i>
G3P	Glicerol 3 fosfato
GAP	<i>GTP-hydrolysis activating protein</i>
GEF	<i>GDP-GTP exchange factor</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GL	Gota lipídica
GM130	<i>Cis-golgi matrix protein 130</i>
GNPAT	Gliceronafofosfato-o-acil transferasa
GPAT	Glicerol-3-fosfato aciltransferasa
H	Hombre
HA	Hemaglutinina
HbA1c	Hemoglobina glicada
HDL	<i>High-density lipoprotein</i>
HFD	<i>High fat diet</i>
HGHI	Hiperglucemia-hiperinsulinemia
HPRT	<i>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>
HSL	<i>Hormone-sensitive lipase</i>
HURS	Hospital Universitario Reina Sofía
IBMX	3-Isobutil-1-metilxantina
IMC	Índice de masa corporal
IR	Insulinorresistencia
ISG15	<i>Interferon-stimulated gene/protein 15</i>
iST	<i>In-stage-tip</i>
JNK	<i>c-Jun N-Terminal kinase</i>
LC	<i>Liquid chromatography</i>
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i>
LPL	Lipoproteína lipasa
LSM	<i>Laser scanning microscope</i>

M	Mujer
M1	Macrófagos tipo 1
MAM	<i>Mitochondria-associated membrane</i>
MCS	<i>Membrane contact site</i>
MEC	Matriz extracelular
MAG	Monoacilglicerol
MGL	Monoacilglicerol lipasa
MIF1	<i>Macrophage Inhibitory Factor-1</i>
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
MS	<i>Mass spectrometry</i>
NCS	<i>Newborn calf serum</i>
NF-kB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NG	Normoglucémicos
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PAP	<i>Phosphatidate phosphatase</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PCR*	Proteína C-reactiva de alta sensibilidad
PFA	Paraformaldehído
PKA	Proteína quinasa A
PLIN1	Perilipina-1
PLIN2	Perilipina-2
PMP70	Peroxisomal membrane protein 70 KDa
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
PPAR	<i>Peroxisome proliferator activated receptor</i>
Rab	<i>Ras-associated binding protein</i>
Ras	<i>Rat sarcoma virus</i>
RE	Retículo endoplásmico
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i>
ROUT	<i>Robust regression and outlier removal</i>
RT-PCR	<i>Real time-polymerase chain reaction</i>
Scr	<i>Scramble</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl-sulfate</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>

SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment proteins receptor</i>
STD	<i>Standard laboratory diet</i>
STX6	<i>Syntaxin-6</i>
TAO	<i>Tejido adiposo omental</i>
TAS	<i>Tejido adiposo subcutáneo</i>
TAG	<i>Triacilglicerol</i>
TNFα	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
UBA1	<i>Ubiquitin like modifier activating enzyme 1</i>
UCHL3	<i>Ubiquitin C-terminal hydrolase L3</i>
UCP1	<i>Uncoupling protein 1</i>
WT	<i>Wild-type</i>

Índice

SUMMARY	1
RESUMEN	9
1. INTRODUCCIÓN	17
1.1. Tejido adiposo	19
1.1.1. Funciones y distribución del tejido adiposo.....	19
1.1.2. Composición del tejido adiposo	21
1.2. Obesidad y comorbilidades asociadas	22
1.2.1. Fibrosis del tejido adiposo	24
1.2.2. Insulinorresistencia	24
1.2.3. Inflamación	26
1.3. Diferenciación adipocitaria o adipogénesis	27
1.4. Regulación del metabolismo lipídico en adipocitos	28
1.5. Gotas lipídicas	31
1.5.1. Biogénesis de gotas lipídicas	32
1.5.2. Proteoma de la cubierta de la gota lipídica	33
1.5.3. Tráfico de proteínas a la cubierta de la gota lipídica	34
1.5.4. Contacto de gotas lipídicas con otros orgánulos	34
1.6. Proteínas Rab	40
1.6.1. Rab18	43
1.6.2. Rab34	44
2. OBJETIVOS	49
3. MATERIALES Y MÉTODOS	53
3.1. Cultivos celulares	55
3.2. Modelos animales	58
3.3. Inmunocitoquímica y microscopía confocal	58
3.4. Vectores de expresión plasmídicos	60
3.5. Estudios de expresión y silenciamiento	61
3.6. Cuantificación de la secreción de adiponectina	61
3.7. Tratamientos experimentales	62
3.8. Immunoblotting	63
3.9. Identificación del interactoma de Rab34	65
3.9.1. Estudios de identificación de biotina dependiente de proximidad	65
3.9.2. Estudios de inmunoprecipitación acoplados a MS/MS.....	67
3.10. Ensayos de co-inmunoprecipitación	68
3.11. Extracción de ARN y Real-Time PCR	68
3.12. Análisis estadísticos	68
4. RESULTADOS	71

4.1. La fibrosis altera la integridad de orgánulos intracelulares en adipocitos 3T3-L1 ..	73
4.2. El tratamiento de lumican dificulta el acceso de Rab18 a las gotas lipídicas	77
4.3. La insulinoresistencia expande el retículo, asociándose a Rab18	81
4.4. La inflamación altera la asociación de orgánulos con el retículo endoplásmico	89
4.5. Rab18 protege del contacto peroxisoma-retículo endoplásmico	97
4.6. Rab18 alcanza la gota lipídica a través del ER en adipocitos humanos	101
4.7. Rab18 presenta dimorfismo sexual en tejido adiposo de pacientes obesos	103
4.8. Rab34 como un modelo de tráfico de proteínas a las gotas lipídicas	106
4.9. Papel de Rab34 en la organización del aparato de Golgi	110
4.10. Papel de Rab34 en la función del adipocito	112
4.10.1. Rab34 regula la secreción y oligomerización de adiponectina	113
4.10.2. Rab34 regula la composición de la cubierta de las gotas lipídicas	114
4.11. Interactoma de Rab34	119
4.12. La interacción Rab34-FABP5 regula el recambio de lípidos en gotas lipídicas ..	122
4.13. Rab34 regula la estabilidad de la proteína FABP5	125
4.14. UBA1 participa en la acción mediada por la interacción Rab34-FABP5	129
4.15. Rab34 en adipocitos humanos y modelos de enfermedad	132
5. DISCUSIÓN	139
CONCLUSIONES	159
CONCLUSIONS	163
REFERENCIAS	167

Summary

SUMMARY

Adipose tissue plays an essential role in the management of the body energy reserves. Adipocytes are the most abundant cells of the adipose tissue and constitute its functional unit. They are specialized in storing energy in the form of neutral lipids (mainly triacylglycerols, TAGs) within lipid droplets (LDs), their most characteristic organelle. In addition, the adipose tissue is a major endocrine organ, secreting signaling molecules, the adipokines, which regulates from food intake and energy balance to inflammation or reproduction, among other body functions.

Obesity is characterized by an abnormal and/or excess accumulation of body fat, with the consequent storage into the adipocyte LD. When adipocytes reach their maximum lipid storage capacity, they become dysfunctional and can no longer store lipids, seriously compromising the maintenance of the body energy homeostasis.

As a result, lipids are deposited in ectopic locations which, together with the changes occurring in the secretion pattern of adipokines, constitute a main risk factor in the development of pathologies such as insulin resistance (IR), type 2 diabetes mellitus (T2DM), inflammatory diseases, hepatic steatosis, cardiovascular disease or even cancer. Furthermore, the secretion of components of the extracellular matrix (ECM) by the adipose tissue is also altered in obesity, so that it becomes more rigid, causing the development of adipose tissue fibrosis, which limits the expansion of adipocytes.

Adipocytes have a complex system of organelles, whose interconnections, mediated largely by Rab proteins (*Ras-associated binding protein*), are determining factors for their physiology. Interestingly, the lipid metabolism of LDs is partially regulated by proteins that are associated with the LD surface, including some members of the Rab family of small GTPases, such as Rab18 and Rab34, both under healthy and pathological conditions.

As a general objective, we propose to characterize the role of these two Rab proteins in inter-organelle contacts and in the control of lipid metabolism in adipocytes, taking the LD as a central hub regulating both processes, in a context

of obesity. Specifically, to achieve this general goal, we have conducted two separate studies, which are summarized in detail below.

FIRST STUDY: *Analysis of inter-organelle contact sites in normal and dysfunctional adipocytes using the small GTPase, Rab18, as a molecular model*

Perturbation of the profile of contacts between organelles has been linked to several diseases such as neurodegenerative diseases and cancer. However, it has not yet been studied whether there is a disruption of contacts between organelles in adipocytes in obesity, especially in relation to their comorbidities, such as IR, which coexists with inflammation and fibrosis of the adipose tissue. In this regard, the study of the interactome of adipocyte organelles can be useful to identify therapeutic targets.

In this work, the morphology and interaction of three fundamental organelles for adipocyte lipid metabolism have been analyzed: LDs, the endoplasmic reticulum (ER) and peroxisomes. Since the GTPase Rab18 has been reported to mediate intracellular lipid trafficking and the formation of some of the contact sites between membranous organelles (membrane contact sites, MCSs), such as the ER-LD interaction, we also analyzed in depth the localization of this GTPase in response to different pathogenic processes associated with obesity.

To this end, 3T3-L1 adipocytes were analyzed upon differentiation in culture models mimicking adipose tissue fibrosis (3D, three-dimensional), hyperglycemia/hyperinsulinemia or inflammation [i.e., after exposure to high concentrations of glucose and insulin or TNF α (tumor necrosis factor alpha); 2D, two-dimensional; 24 h], respectively. After treatments, cells were processed for single-confocal microscopy studies or confocal super-resolution microscopy studies. For these cellular analyses, immunocytochemistry combined with morphometric analysis was used using Fiji/ImageJ *software*. These analyses were complemented with functional studies using Rab18 siRNA, to analyze changes in the profile of intracellular MCSs. Overexpression studies of Rab18 were also carried out, which enabled us to demonstrate the access pathway of

Rab18 to LD in human adipose tissue, which occurs via ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC).

Furthermore, our results linked obesity-derived fibrosis with both ER fragmentation and the modification of Rab18 localization to the ER subdomains connecting with LDs and peroxisomes. Specifically, under fibrotic conditions Rab18 was retained in the ER-LD bridges.

On the other hand, hyperglycemia/hyperinsulinemia and inflammation conditions increased ER-LD contacts, an effect that has been associated with defects in LD biogenesis, or alterations in the translocation of proteins to mature LDs through the ERGIC or ER exit sites (ERES) pathways. Likewise, both pathogenic conditions increased ER-peroxisome contacts, which has been related to disorders of peroxisome biogenesis and plasmalogen synthesis. It was observed that hyperglycemia/hyperinsulinemia also caused ER expansion, without altering the dynamics of peroxisomes. Furthermore, both hyperglycemia/hyperinsulinemia and inflammation resulted in the accumulation of Rab18 in specific domains of the ER other than the ER-peroxisome contact zones.

Finally, we evaluated Rab18 content in adipose tissue samples from normoglycemic (NG), IR, and T2DM subjects with obesity. These studies demonstrated that Rab18 has a sexually dimorphic expression pattern in NG individuals with obesity.

Taken together, our results suggest an important role for Rab18 in adipocyte biology, especially in the formation and maintenance of ER-LD and ER-peroxisome contacts (which are altered in obesity). The involvement of Rab18 in both processes could be related to the regulation of oxidative and/or lipid metabolism.

SECOND STUDY: *Functional characterization of Rab34 in adipocytes and regulation of this GTPase in response to obesity-associated pathogenic processes*

Recently, our laboratory identified the presence of Rab34 in the proteome of LDs isolated from adipocytes, which suggested a role for this GTPase in the regulation of LD homeostasis and/or function. Confocal microscopy studies of adipocytes showed a dual distribution of Rab34, since it localized to the Golgi apparatus or the LD surface at early or late stages of adipocyte differentiation, respectively. However, the trafficking pathway followed by Rab34 (and, for that matter, for any other LD-associated protein) from the Golgi apparatus to reach the LDs or the impact of traffic interruption have been never depicted. The use of imaging techniques has allowed us to investigate the transport of Rab34 upon blockage of intracellular membrane transport by exposing adipocytes to brefeldin A (BFA). This pharmacological approach enabled the identification of a novel translocation route of Rab34 from the Golgi apparatus to the LDs that involves an initial retrograde pathway from the Golgi to the ER, followed by the subsequent diffusion from the ER to the LD surface through ERES domains connecting both organelles.

Regarding Rab34 functions, we showed that, when located to the organelles related to the secretory pathway, Golgi apparatus and the ER, this GTPase may regulate the oligomerization and release of the insulin-sensitizing adipokine, adiponectin. To delve deeper into a potential role of Rab34 at the LDs in relation to lipid metabolism, expression and silencing studies were carried out in 3T3-L1 cells. Likewise, expression and interactome studies were performed to identify candidate proteins that interact with Rab34. Confocal microscopy studies were combined with biochemical approaches (co-immunoprecipitation) and functional studies to assess the role played by Rab34 effectors on adipocytes function. Taken together, our results suggest that Rab34 associates with FABP5 (fatty acid binding protein 5), a lipid chaperone that regulates intracellular lipid trafficking and coactivates the LD-associated lipase, hormone-sensitive lipase (HSL). Furthermore, analysis of the role of Rab34-FABP5 interaction on adipocyte function enabled us to unveil that the function of Rab34 in lipid homeostasis (i.e., increased lipid accumulation associated with decreased lipolysis) is mediated by

the induction of proteasomal degradation of FABP5 through activation of the ubiquitin/proteasome associated enzyme, UBA1 (*ubiquitin like modifier activating enzyme 1*).

Taken together, our results indicate that Rab34 could represent a promising therapeutic target and/or biomarker of both protein trafficking in adipocytes and regulation of lipid accumulation in adipocytes in obesity.

Resumen

RESUMEN

El tejido adiposo desempeña un papel esencial en la gestión de las reservas energéticas del organismo. Los adipocitos son las células más abundantes del tejido adiposo y constituyen su unidad funcional. Están especializados en el almacenamiento de energía en forma de lípidos neutros (principalmente triacilglicérolos, TAG) dentro de las gotas lipídicas (GLs), su orgánulo más característico. Además, el tejido adiposo es un importante órgano endocrino, secretor de moléculas señalizadoras, las adipoquinas, que regulan desde la ingesta de alimentos y el balance energético hasta la inflamación o la reproducción, entre otras funciones corporales.

La obesidad se caracteriza por una acumulación anormal y/o excesiva de grasa corporal, con el consiguiente almacenamiento en las GLs del adipocito. Cuando los adipocitos alcanzan su capacidad máxima de almacenamiento de lípidos, se vuelven disfuncionales y ya no pueden almacenar más lípidos, comprometiendo seriamente el mantenimiento de la homeostasis energética corporal.

Como consecuencia, los lípidos se depositan en localizaciones ectópicas que, junto con los cambios que se producen en el patrón de secreción de adipoquinas, constituyen un factor de riesgo principal en el desarrollo de patologías como la insulinoresistencia (IR), la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), las enfermedades inflamatorias, la esteatosis hepática, las enfermedades cardiovasculares o incluso el cáncer. Además, la secreción de componentes de la matriz extracelular (MEC) por parte del tejido adiposo también se ve alterada en la obesidad, de modo que éste se vuelve más rígido, lo que provoca el desarrollo de fibrosis del tejido adiposo, que limita la expansión de los adipocitos.

Los adipocitos poseen un complejo sistema de orgánulos, cuyas interconexiones, mediadas en gran medida por las proteínas Rab (*Ras-associated binding protein*), son determinantes para su fisiología. Curiosamente, el metabolismo lipídico de las GLs está parcialmente regulado por proteínas que se asocian a la superficie de la GL, incluyendo algunos miembros de la familia Rab de pequeñas GTPasas, como Rab18 y Rab34, tanto en condiciones sanas como patológicas.

Como objetivo general, nos proponemos caracterizar el papel de estas dos proteínas Rab en los contactos inter-orgánulos y en el control del metabolismo lipídico en adipocitos, tomando la GL como eje central regulador de ambos procesos, en un contexto de obesidad. En concreto, para alcanzar este objetivo general, hemos llevado a cabo dos estudios separados, que se resumen en detalle a continuación.

PRIMER ESTUDIO: Análisis de los sitios de contacto inter-orgánulos en adipocitos normales y disfuncionales usando la pequeña GTPasa, Rab18, como un modelo molecular

La alteración del perfil de contactos entre orgánulos se ha relacionado con varias enfermedades, como las neurodegenerativas y el cáncer. Sin embargo, aún no se ha estudiado si existe una alteración de los contactos entre orgánulos en los adipocitos en obesidad, especialmente en relación con sus comorbilidades, como la IR, que coexiste con inflamación y fibrosis del tejido adiposo. En este sentido, el estudio del interactoma de los orgánulos adipocitarios puede ser útil para identificar dianas terapéuticas.

En este trabajo se ha analizado la morfología e interacción de tres orgánulos fundamentales para el metabolismo lipídico de los adipocitos: las GLs, el retículo endoplásmico (RE) y los peroxisomas. Dado que se ha descrito que la GTPasa Rab18 media en el tráfico intracelular de lípidos y en la formación de algunos de los sitios de contacto entre orgánulos membranosos (membrane contact sites, MCSs), como la interacción RE-GL, también hemos analizado en profundidad la localización de esta GTPasa en respuesta a diferentes procesos patológicos asociados a la obesidad.

Para ello, se analizaron adipocitos 3T3-L1 tras su diferenciación en modelos de cultivo que imitaban fibrosis de tejido adiposo (3D, tridimensional), hiperglucemia/hiperinsulinemia o inflamación [es decir, tras la exposición a altas concentraciones de glucosa e insulina o TNF α (*tumor necrosis factor alpha*); 2D, bidimensional; 24 h], respectivamente. Tras los tratamientos, las células se procesaron para estudios de microscopía confocal simple o de microscopía confocal de superresolución. Para estos análisis celulares se utilizó

inmunocitoquímica combinada con análisis morfométrico mediante el *software* Fiji/ImageJ. Estos análisis se complementaron con estudios funcionales utilizando Rab18 siRNA, para analizar los cambios en el perfil de los MCS intracelulares. También se llevaron a cabo estudios de sobreexpresión de Rab18, que nos permitieron demostrar la vía de acceso de Rab18 a la GL en el tejido adiposo humano, que se produce a través del compartimento intermedio ER-Golgi (ERGIC).

Además, nuestros resultados relacionaron la fibrosis derivada de la obesidad tanto con la fragmentación del RE como con la modificación de la localización de Rab18 en los subdominios del RE que conectan con las GLs y los peroxisomas. Concretamente, en condiciones fibróticas Rab18 se mantuvo en los puentes ER-LD.

Por otro lado, las condiciones de hiperglucemia/hiperinsulinemia e inflamación aumentaron los contactos ER-LD, un efecto que se ha asociado a defectos en la biogénesis de las GLs, o a alteraciones en la translocación de proteínas a las GLs maduras a través de las vías ERGIC o *ER exit sites* (ERES). Asimismo, ambas condiciones patogénicas aumentaron los contactos ER-peroxisoma, lo que se ha relacionado con trastornos de la biogénesis peroxisomal y de la síntesis de plasmalógenos. Se observó que la hiperglucemia/hiperinsulinemia también provocaba la expansión del RE, sin alterar la dinámica de los peroxisomas. Además, tanto la hiperglucemia/hiperinsulinemia como la inflamación provocaron la acumulación de Rab18 en dominios específicos del RE distintos de las zonas de contacto RE-peroxisoma.

Por último, evaluamos el contenido de Rab18 en muestras de tejido adiposo de sujetos normoglucémicos (NG), con IR y con DMT2 con obesidad. Estos estudios demostraron que Rab18 tiene un patrón de expresión sexualmente dimórfico en individuos NG con obesidad.

En conjunto, nuestros resultados sugieren un importante papel de Rab18 en la biología de los adipocitos, especialmente en la formación y mantenimiento de los contactos RE-GL y RE-peroxisoma (que están alterados en la obesidad). La implicación de Rab18 en ambos procesos podría estar relacionada con la regulación del metabolismo oxidativo y/o lipídico.

SEGUNDO ESTUDIO: *Caracterización funcional de Rab34 en adipocitos y regulación de esta GTPasa en respuesta a procesos patológicos asociados a obesidad*

Recientemente, nuestro laboratorio identificó la presencia de Rab34 en el proteoma de las GLs aisladas de adipocitos, lo que sugirió un papel de esta GTPasa en la regulación de la homeostasis y/o función de las GLs. Estudios de microscopía confocal de adipocitos mostraron una distribución dual de Rab34, ya que se localizaba en el aparato de Golgi o en la superficie de las GLs en fases tempranas o tardías de la diferenciación adipocitaria, respectivamente. Sin embargo, nunca se ha descrito la vía de tráfico seguida por Rab34 (ni por cualquier otra proteína asociada a la GL) desde el aparato de Golgi hasta alcanzar las GLs, ni el impacto de la interrupción de su tráfico. El uso de técnicas de imagen nos ha permitido investigar el transporte de Rab34 tras el bloqueo del transporte intracelular de membrana mediante la exposición de adipocitos a brefeldina A (BFA). Este enfoque farmacológico permitió la identificación de una nueva ruta de translocación de Rab34 desde el aparato de Golgi a las GLs que implica una vía retrógrada inicial desde el Golgi al RE, seguida de la posterior difusión desde el RE a la superficie de las GLs a través de dominios ERES que conectan ambos orgánulos.

En cuanto a las funciones de Rab34, demostramos que, cuando se localiza en los orgánulos relacionados con la vía secretora, el aparato de Golgi y el RE, esta GTPasa puede regular la oligomerización y liberación de la adipoquina sensibilizadora a la insulina, la adiponectina. Para profundizar en un posible papel de Rab34 en las GLs en relación con el metabolismo lipídico, se llevaron a cabo estudios de expresión y silenciamiento en células 3T3-L1. Asimismo, se realizaron estudios de expresión e interactoma para identificar proteínas candidatas que interaccionan con Rab34. Los estudios de microscopía confocal se combinaron con enfoques bioquímicos (co-inmunoprecipitación) y estudios funcionales para evaluar el papel desempeñado por los efectores de Rab34 en la función de los adipocitos. En conjunto, nuestros resultados sugieren que Rab34 se asocia con FABP5 (*fatty acid binding protein 5*), una chaperona lipídica que regula el tráfico intracelular de lípidos y coactiva la lipasa asociada a GL, la lipasa sensible a hormonas (HSL). Además, el análisis del papel de la interacción

Rab34-FABP5 en la función de los adipocitos nos permitió desvelar que la función de Rab34 en la homeostasis lipídica (es decir, el aumento de la acumulación de lípidos asociado a la disminución de la lipólisis) está mediada por la inducción de la degradación proteasomal de FABP5 a través de la activación de la enzima asociada a ubiquitina/proteasoma, UBA1 (*ubiquitin like modifier activating enzyme 1*).

En conjunto, nuestros resultados indican que Rab34 podría representar una diana terapéutica prometedora y/o un biomarcador tanto del tráfico de proteínas en los adipocitos como de la regulación de la acumulación de lípidos en los adipocitos en la obesidad.

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Tejido adiposo

El tejido adiposo es un tipo de tejido conjuntivo de origen mesenquimal que constituye un órgano altamente dinámico y metabólicamente activo con un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis energética del organismo (Frigolet and Gutiérrez-Aguilar, 2020). Representa del 20 al 28% de la masa corporal, aunque estas proporciones pueden cambiar en función del sexo y el estado energético (Frigolet and Gutiérrez-Aguilar, 2020).

El tejido adiposo se clasifica histológica y funcionalmente en tres subtipos: el tejido adiposo blanco, que ocupa un 95% o más del tejido adiposo; el tejido adiposo marrón, que compone aproximadamente un 2%; y el tejido adiposo beige, que constituye el 3% (Kahn et al., 2019).

1.1.1. Funciones y distribución del tejido adiposo

El tejido adiposo blanco actúa como el principal reservorio energético del organismo y está especializado en almacenar el exceso de energía tras la ingesta. Así, los ácidos grasos procedentes de la dieta se almacenan en forma de triacilgliceroles (TAGs) provenientes de la dieta, y movilizarlos en periodos de déficit energético para que sean utilizados como combustible por otros tejidos (Ducharme and Bickel, 2008; Ghaben and Scherer, 2019; Rutkowski et al., 2015). Además, el tejido adiposo blanco también capta glucosa que se emplea no solo para obtener energía a través de la glucólisis y mantener la función celular si no también, para la síntesis de glicerol, que es necesario para la esterificación de los ácidos grasos y la síntesis de TAGs (Malagon et al., 2014). Adicionalmente, el tejido adiposo blanco también cumple funciones mecánicas como amortiguador, protector y soporte de órganos internos (p.ej., corazón, glándulas adrenales, riñones y ovarios) así como de regiones anatómicas externas sometidas a gran estrés mecánico (p.ej., palmas, talones y glúteos) (Ahima, 2006; Frayn et al., 2003; Ghaben and Scherer, 2019; Rodríguez et al., 2015). Asimismo, el tejido adiposo blanco lleva a cabo importantes funciones endocrinas, produciendo y secretando moléculas señalizadoras, las adipoquinas, que participan en procesos tan variados como el control de la

inmunidad (i.e., regulación de procesos inflamatorios, incluyendo la modulación paracrina de la respuesta inflamatoria) (Schoettl et al., 2018), la función vascular (Frayn et al., 2003; Rodríguez et al., 2015), la termogénesis y la homeostasis energética (Kahn et al., 2019), la función neuroendocrina (Ducharme and Bickel, 2008; Rutkowski et al., 2015) y la ingesta (i.e., regulación del apetito a nivel hipotalámico) (Kahn et al., 2019), entre otras. Respecto a este último proceso, entre las funciones endocrinas del tejido adiposo destacan hormonas como la leptina, cuyo nivel de secreción aumenta cuando se produce un incremento de la masa de tejido adiposo (Crujeiras et al., 2015). Esta hormona actúa sobre receptores específicos a nivel del hipotálamo, inhibiendo la sensación de hambre y, por tanto, regulando negativamente la ingesta (Crujeiras et al., 2015).

En cuanto a su distribución, el tejido adiposo blanco se localiza principalmente en dos depósitos con diferente organización anatómica: el tejido adiposo visceral u omental (TAO), que se localiza rodeando a los órganos internos y constituye el 20% del total del tejido adiposo, y el tejido adiposo subcutáneo (TAS), que se encuentra bajo la piel y constituye el 80% restante (Chait and den Hartigh, 2020; Guglielmi and Sbraccia, 2018; Oikonomou and Antoniadou, 2018; Reddy et al., 2019). En concreto, en humanos, el TAO se encuentra en los depósitos pélvico, abdominal y mediastinal, y el TAS entre la epidermis y el músculo (Cinti, 2019). La acumulación de TAO está relacionada con un mayor riesgo metabólico (i.e., resistencia a insulina, arteriosclerosis, hipertensión y diabetes tipo 2), mientras que la acumulación de TAS no se asocia a estos efectos, habiéndose propuesto un papel protector para este depósito desde el punto de vista metabólico (Kahn et al., 2019). En este sentido, se ha propuesto que cuando la capacidad de almacenar lípidos por parte de TAO es sobrepasada, ya sea por la incapacidad de generar nuevos adipocitos (hiperplasia limitada) o la capacidad de expandir adipocitos ya presentes (hipertrofia limitada), los lípidos se acumulan mayormente en TAS, especialmente en pacientes con lipomatosis simétrica múltiple (Freedland, 2004).

Los depósitos grasos también se diferencian respecto a su respuesta a los principales reguladores del tejido adiposo. Así, el TAS es más sensible a insulina, favoreciendo así la captación de glucosa y acumulación de lípidos, mientras que el TAO es metabólicamente más activo, presentando más sensibilidad a

glucocorticoides y catecolaminas y una actividad lipolítica mayor, liberando así ácidos grasos al torrente sanguíneo en condiciones de déficit calórico (Chait and den Hartigh, 2020).

Por otro lado, desde un punto de vista funcional, el tejido adiposo marrón y el tejido adiposo beige se distinguen del tejido adiposo en cuanto a que se encargan de disipar la energía acumulada en forma de calor mediante el proceso de termogénesis sin escalofrío. Así, las células de estos tejidos expresan la proteína mitocondrial proteína desacoplante 1 (*uncoupling protein 1*, UCP1), la cual estimula la producción de calor actuando en la membrana mitocondrial interna como un canal de fuga de protones que permite desvincular la respiración de la síntesis de ATP (Lynes and Tseng, 2018; Rodríguez et al., 2015; Virtanen et al., 2009). En el tejido adiposo beige, la expresión de la proteína UCP1 es inducida, entre otros factores, en respuesta al estrés por frío, a agonistas de los receptores adrenérgicos β_3 , hormonas tiroideas, factores de crecimiento y señalización celular, ácidos grasos y ejercicio físico (Scheel et al., 2022). Este proceso es conocido como pardeamiento del tejido adiposo y desencadena la movilización de los lípidos almacenados, con la subsecuente oxidación y liberación de energía (Luo and Liu, 2016; Lynes and Tseng, 2018). En cuanto a su distribución, el tejido adiposo marrón se encuentra en ubicaciones anatómicas altamente vascularizadas, como entre los omoplatos, alrededor de los riñones, el cuello, el área supraclavicular, y a lo largo de la médula espinal; el tejido adiposo beige se localiza de forma dispersa por el tejido adiposo (Cedikova et al., 2016).

Para simplificar, a partir de ahora nos referiremos al tejido adiposo blanco de forma genérica como “tejido adiposo”.

1.1.2. Composición del tejido adiposo

A nivel de composición celular, el tejido adiposo está constituido por adipocitos maduros y otros tipos celulares que componen la denominada fracción de estroma vascular (FEV) (Kahn et al., 2019; Silva et al., 2017). Entre estos últimos se encuentran: células endoteliales de vasos sanguíneos y pericitos (forman la microvasculatura del tejido adiposo), células sanguíneas (eritrocitos,

macrófagos, linfocitos, neutrófilos, eosinófilos y otros tipos celulares inflamatorios del sistema inmune) (Silva et al., 2017, 2015), fibroblastos, células madre mesenquimales y preadipocitos (Esteve Ràfols, 2014; Gimble et al., 2011; Lynes and Tseng, 2018). Las células madre mesenquimales y los preadipocitos son responsables de originar y renovar las células maduras del tejido adiposo (Rodeheffer et al., 2008), mientras que las células sanguíneas mantienen la homeostasis tisular (Seijkens et al., 2014).

La proporción de los distintos tipos celulares es diferente según el tipo de tejido adiposo en cuestión, su localización, el depósito y la condición metabólica del mismo (Esteve Ràfols, 2014; Lynes and Tseng, 2018). Existen tres tipos de adipocitos en mamíferos, de acuerdo al tipo de tejido adiposo del que forman parte: blancos, marrones y beige, los cuales también se diferencian por su origen, morfología y abundancia de mitocondrias (Bloor and Symonds, 2014; Frigolet and Gutiérrez-Aguilar, 2020; Kuerschner et al., 2008; Luo and Liu, 2016). Los adipocitos blancos se encuentran en el tejido adiposo blanco, se caracterizan por contener una única gran gota lipídica (GL; unilocular) central esférica, de tamaño variable (20-200 μm de diámetro en humanos), que desplaza al núcleo y al resto de orgánulos a la periferia celular (Bloor and Symonds, 2014; Kuerschner et al., 2008). Por su parte, los adipocitos marrones que componen el tejido adiposo marrón, tienen numerosas GLs (multiloculares) y, a diferencia de los adipocitos blancos, contienen una gran cantidad de mitocondrias (Frigolet and Gutiérrez-Aguilar, 2020; Luo and Liu, 2016). Finalmente, los adipocitos beige se encuentran en los depósitos típicos del tejido adiposo blanco, y presentan características semejantes a los marrones, pues también tienen GLs multiloculares y abundantes mitocondrias (Frigolet and Gutiérrez-Aguilar, 2020; Luo and Liu, 2016) para la disipación de energía a través de la respiración mitocondrial desacoplada, liberando de esta forma calor (Nedergaard et al., 2011).

1.2. Obesidad y comorbilidades asociadas

La obesidad es una enfermedad cuya prevalencia ha incrementado en las últimas décadas y está influida por factores humorales, genéticos y ambientales. Entre los factores ambientales destaca el descenso de la actividad física, el estilo

de vida sedentario, el mayor consumo de comida demasiado calórica y el uso de medicamentos cuyo efecto secundario es la ganancia de peso corporal y la expansión desmesurada del tejido adiposo (Medici et al., 2015).

La expansión del tejido adiposo es un fenómeno que ocurre en periodos de ganancia energética de manera fisiológica, combinado con periodos de déficit energético manteniéndose en equilibrio. En situaciones de sobrecarga prolongada de energía, se produce un desequilibrio entre la energía ingerida y gastada (Goossens and Blaak, 2015), que desencadena la ganancia de peso del individuo, la cual, si es excesiva, desemboca en el desarrollo de sobrepeso y obesidad. En estas condiciones los depósitos del tejido adiposo sufren una remodelación aumentando su volumen para adaptarse a dicho exceso de energía, acumulándolo en forma de lípidos (Goossens and Blaak, 2015).

Específicamente, este aumento se produce principalmente por un aumento del tamaño de los adipocitos existentes (hipertrofia) (Rosen and Spiegelman, 2006) y por un reclutamiento adicional de nuevas células madre mesenquimales y preadipocitos (hiperplasia de los adipocitos), mediante la secreción de adipoquinas (principalmente adiponectina), que además promueven su diferenciación a adipocitos maduros (Oikonomou and Antoniades, 2018; Spalding et al., 2008). Sin embargo, cuando los adipocitos del tejido adiposo se hipertrofian a su límite máximo no son capaces de hacer frente a la sobrecarga energética, porque se limita su capacidad de almacenamiento de lípidos. Cuando esta condición se cronifica en el tiempo los lípidos se acumulan en otros órganos y tejidos no especializados para el almacenamiento de lípidos (localizaciones ectópicas) generando el llamado fenómeno de lipotoxicidad (Saponaro et al., 2015). Dicha lipotoxicidad se asocia con el desarrollo de IR, inflamación y fibrosis, que son los principales factores de riesgo para el desarrollo de patologías, como la DM2, así como otras comorbilidades asociadas a la obesidad como son dislipemia, hipertensión y enfermedad cardiovascular, las cuales constituyen el llamado síndrome metabólico (Srikanthan et al., 2016).

Interesantemente, la expansión de cada tipo de depósito graso afecta de manera diferencial a la homeostasis del individuo con obesidad (Hill et al., 2018; Samson and Garber, 2014). En particular, el aumento de TAO en obesidad se asocia más con el desarrollo de IR e inflamación crónica y fibrosis (Hill et al., 2018; Samson

and Garber, 2014). Así se ha demostrado que el TAO de personas que muestran un fenotipo con mayor acumulación de dicho tejido presenta una mayor situación de hipoxia posiblemente influenciada en parte por la mayor infiltración de macrófagos, que es bastante superior a la que tienen en el TAS (Hill et al., 2018; Samson and Garber, 2014).

1.2.1. Fibrosis del tejido adiposo

Se ha observado que los adipocitos de pacientes obesos están sometidos a un mayor estrés mecánico, que podría limitar su capacidad de expansión debido a una mayor acumulación de colágeno y a un cambio en el patrón de secreción de elementos de MEC, que hace que se vuelva más rígida por un mayor entrecruzamiento de las fibras de colágeno, causando la aparición de fibrosis (Virtue and Vidal-Puig, 2010).

La hipoxia derivada de esta condición, a su vez, retroalimenta el desarrollo de fibrosis (Sun et al., 2011) y provoca una mayor producción de citoquinas proinflamatorias como interleucina 6 (IL-6), factor de necrosis tumoral alfa (*tumour necrosis factor alpha*, TNF α) y factor inhibidor de la migración de macrófagos (*Macrophage Inhibitory Factor-1*, MIF1) (Esteve Ràfols, 2014; Schoettl et al., 2018). El aumento de la producción de citoquinas proinflamatorias provoca que la población de células inmunes en el TAO crezca drásticamente, especialmente macrófagos tipo 1 (M1), lo que promueve inflamación crónica. Dicha fibrosis dificulta la angiogénesis requerida en el tejido adiposo, por lo que esta condición patológica está estrechamente relacionada con el mantenimiento de hipoxia e inflamación. Así, la fibrosis también es un factor importante en el desarrollo de IR (Lin et al., 2016).

1.2.2. Insulinorresistencia

Más profundamente, en relación con la IR, esta condición patológica provoca que el tejido adiposo no responda correctamente a los niveles de insulina fisiológicos, ya que se produce insensibilización del receptor de insulina, por lo que la concentración de glucosa en sangre puede sobrepasar niveles normales, provocando hiperglucemia. Adicionalmente, esta situación promueve una mayor

síntesis de insulina (hiperinsulinemia) por las células β pancreáticas, como respuesta al elevado nivel de glucosa en sangre. Así, esta condición patológica es conocida como hiperglucemia-hiperinsulinemia (HGHI) y constituye un factor de riesgo para el desarrollo de síndrome metabólico, e incluso ciertos tipos de cáncer (Barazzoni et al., 2018; Haczeyni et al., 2018).

Actualmente no se conocen con exactitud todos los factores celulares del desarrollo de IR implicados en la remodelación patológica del tejido adiposo, no obstante, se está avanzando progresivamente en este campo. Un ejemplo es el hallazgo de que la distribución y tamaño de las GLs de los adipocitos alteran la función de otros orgánulos celulares e influyen en la sensibilidad del tejido adiposo a la insulina (Alcalá et al., 2017).

En particular, en condiciones obesogénicas, la acumulación de lípidos en los adipocitos (hipertrofia) aumenta el tamaño de sus GLs, lo que provoca estrés celular (p.ej., estrés oxidativo, estrés del RE, estrés mitocondrial, estrés mecánico), transformándose en células disfuncionales o incluso apoptóticas (Alcalá et al., 2017). Tales procesos activan cascadas de rutas inflamatorias en los adipocitos, como la ruta de las quinasas c-Jun N-Terminal (*c-Jun N-Terminal kinases*, JNK) e I κ B (IKK)/NF κ B, induciendo la expresión y secreción de citoquinas y quimioquinas, como IL-6 y TNF α , que a su vez inducen la expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1) en el endotelio, contribuyendo a la infiltración del tejido por macrófagos que liberan citoquinas proinflamatorias y amplifican el efecto iniciado por los adipocitos (Lauterbach and Wunderlich, 2017; Lin et al., 2016; Sun et al., 2011). El sumatorio de todos estos factores también interfiere con la señalización de la insulina y causa muerte celular así como resistencia a esta hormona en el tejido adiposo y otros tejidos (Kahn and Flier, 2000; Phosat et al., 2017; Pulido et al., 2012; Rodríguez et al., 2015; Rutkowski et al., 2015).

En este sentido, se produce una inhibición de la translocación dependiente de insulina de GLUT4, transportador de glucosa, a la membrana plasmática del adipocito, lo que contribuye al desarrollo de IR, reduciendo la capacidad lipogénica del adipocito y comprometiendo la función del mismo (Rydén et al., 2002). Por otro lado, en condiciones normales, cuando las GLs disminuyen su tamaño, la translocación de GLUT4 dependiente de insulina hacia la membrana

plasmática aumenta, lo que indica un aumento de la sensibilidad del tejido adiposo a dicha hormona (Kim et al., 2019).

1.2.2. Inflamación

Además de ser causada por la IR como se comentó en el apartado anterior, la inflamación también es debida tanto a la saturación de ácidos grasos por parte del tejido adiposo, como a la deposición de lípidos en tejidos y órganos no especializados para su gestión, en los que también inducen apoptosis e infiltración de células del sistema inmune (principalmente macrófagos y linfocitos T) (Bourgeois et al., 2019; Kahn and Flier, 2000; Phosat et al., 2017).

Esta última causa también puede poner en marcha un proceso de inflamación crónica [(aumento constante de los niveles de TNF α , interleucina 6, resistina y la *acylation stimulating protein* (ASP)] que puede influir en la aparición de comorbilidades de la obesidad, como son las descritas previamente (Srikanthan et al., 2016), además de mayor predisposición a infecciones víricas, esteatosis pancreática, IR en el tejido hepático, enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) y su subtipo más patológico: la esteatosis hepática no alcohólica (NASH) (Bourgeois et al., 2019; Howarth et al., 2012; Kory et al., 2016; Patni and Garg, 2015).

Esta inflamación crónica también se caracteriza por la secreción anormal de adipoquinas (Kahn et al., 2019). Se ha demostrado que en la obesidad mórbida se produce un descenso de las adipoquinas antiinflamatorias (p. ej., adiponectina), lo que modifica la sensibilidad a la insulina y causa IR (Rydén et al., 2002). Además, la inflamación asociada a la obesidad, agrava los efectos de esta IR ya que el principal factor proinflamatorio, TNF α , es capaz de promover la hidrólisis de TAGs e inhibir el transporte de glucosa inducido por insulina, reduciendo la capacidad del adipocito de almacenar la grasa y favoreciendo el fenómeno de lipotoxicidad (Rydén et al., 2002). Por otro lado, algunas adipoquinas proinflamatorias activan células endoteliales favoreciendo la infiltración de los macrófagos en el tejido adiposo (Bourgeois et al., 2019; Kahn and Flier, 2000; Phosat et al., 2017). Los macrófagos secretan múltiples citoquinas proinflamatorias contribuyendo a la inflamación local y sistémica,

considerándose una fuente adicional de mediadores solubles (Gómez et al., 2009). Sin embargo, la polaridad de estos varía durante la progresión de la obesidad, produciéndose un incremento de los macrófagos M1 (proinflamatorios) y un descenso de los macrófagos M2 (antiinflamatorios) (Kahn et al., 2019). Por otro lado, la proporción de subtipos de linfocitos T se ve alterada conforme avanza la obesidad habiendo una mayor presencia de linfocitos T citotóxicos CD8+ y una menor infiltración de linfocitos T reguladores (Kahn et al., 2019).

La alteración del perfil secretor de adipocinas en adipocitos bajo estas condiciones de obesidad (Oikonomou and Antoniades, 2018) también es responsable de estimular la acumulación ectópica de lípidos en tejidos y órganos no adiposos y retroalimenta el fenotipo proinflamatorio (Goossens and Blaak, 2015; Saponaro et al., 2015).

El conjunto de todas estas comorbilidades asociadas a la obesidad y los riesgos para la salud que presentan forman parte del síndrome metabólico (Samson and Garber, 2014; Srikanthan et al., 2016).

1.3. Diferenciación adipocitaria o adipogénesis

La adipogénesis define el proceso por el cual las células madre mesenquimales se diferencian hasta preadipocitos y, éstos, hasta adipocitos maduros. Requiere la acción coordinada de diversos efectores extracelulares, rutas de señalización intracelulares y factores de transcripción (John et al., 2006; Karahuseyinoglu et al., 2008; Rodríguez et al., 2015; White and Stephens, 2010), que conducen a la determinación y diferenciación terminal hasta un adipocito maduro (Rodríguez et al., 2015).

La adipogénesis se puede dividir en varias etapas: determinación, parada del crecimiento celular, expansión clonal y diferenciación terminal (Otto and Lane, 2008). La diferenciación de los preadipocitos en etapas iniciales de la adipogénesis es inducida por factores hormonales, que dan lugar a la expresión de las proteínas *CCAAT/enhancer-binding proteins* (C/EBPs), principalmente C/EBP β y C/EBP δ , las cuales inducen la expansión clonal mitótica (varias rondas de división celular por mitosis) de los preadipocitos (Tang and Lane, 2012) y,

posteriormente, la expresión de los principales factores adipogénicos: el receptor de activación de proliferación de peroxisomas (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*, PPAR γ) y C/EBP α (Christodoulides et al., 2009; John et al., 2006). Estos factores estimulan su propia transcripción y activan a una gran variedad de efectores intracelulares que definirán el fenotipo adipocitario (Christodoulides et al., 2009). Así, en el transcurso de la adipogénesis y en virtud de las cascadas de transcripción activadas por estos factores, se produce la transición desde preadipocitos carentes de GLs, de tipo fibroblástico, a células redondeadas, que van acumulando lípidos de forma progresiva en GLs que, a su vez, aumentan de tamaño hasta coalescer en una única gran GL, característica del adipocito maduro (Cristancho and Lazar, 2011). Tras esta fase, su diferenciación concluye al alcanzar la morfología de adipocitos maduros, especializados en el almacenamiento de energía en forma de TAGs (Tang and Lane, 2012).

1.4. Regulación del metabolismo lipídico en adipocitos

Los diferentes procesos implicados en el almacenamiento y la utilización de la reserva energética contenida en las GLs de los adipocitos, están sujetos a un sistema de regulación multifactorial (Czech et al., 2013; Malagon et al., 2014). Por un lado, la insulina es el principal regulador endocrino de los procesos anabólicos de almacenamiento de reservas energéticas procedentes del exceso de nutrientes en forma de TAGs en el interior de las GLs (lipogénesis) (Ladeira et al., 2016; Malagon et al., 2014; Moro et al., 2004; Saltiel and Kahn, 2001). Mientras que otras señales como las que subyacen a la demanda energética, déficit de ácidos grasos en sangre, el ayuno, las catecolaminas o los péptidos natriuréticos regulan la liberación de dichas reservas energéticas, hidrolizando los TAGs en ácidos grasos y glicerol (lipolisis) (Czech et al., 2013; Frühbeck et al., 2014; Moro et al., 2004). Esta regulación es posible gracias a la interacción de los adipocitos del tejido adiposo con el resto del organismo (Duncan et al., 2007; Tang and Lane, 2012).

Puesto que la principal función del adipocito es el almacenamiento de energía en forma de lípidos, la insulina juega un papel fundamental en la regulación

metabólica del mismo (Haczeyni et al., 2018). Por tanto, la sensibilidad del tejido adiposo a la insulina es clave para un correcto mantenimiento de la homeostasis energética y metabólica (Haczeyni et al., 2018). Así, la insulina es capaz de promover la síntesis y almacenamiento de glúcidos, lípidos y proteínas, e inhibir su degradación (Saltiel and Kahn, 2001). La insulina también induce la expresión de enzimas lipogénicas (Ladeira et al., 2016; Malagon et al., 2014; Rodríguez et al., 2015). No obstante, su función fundamental en la mayoría de los tejidos periféricos es incrementar la captación de glucosa, disminuyendo de esta manera la concentración de glucosa en sangre (Frayn et al., 2003). Por su parte, la glucosa puede ser empleada tanto para la obtención de energía, necesaria para la función celular, como para la síntesis de glicerol, el cual es necesario para la esterificación de los ácidos grasos durante la síntesis de TAGs (Krahmer et al., 2013) en la llamada: i) lipogénesis *de novo*, a partir de acetil coenzima A (acetil-CoA) (producido a partir de moléculas de citrato que se originan en el ciclo de Krebs) y ácidos grasos sintetizados de manera endógena en el interior del adipocito; ii) lipogénesis postprandial, a partir de ácidos grasos incorporados en la dieta y captados por el adipocito desde el medio extracelular (Yilmaz et al., 2016).

Ambas rutas metabólicas se ven estimuladas por la presencia de niveles elevados de glucosa en sangre y la consecuente liberación de insulina en el páncreas por parte de las células β pancreáticas, la cual favorece la captación de glucosa principalmente por parte de los adipocitos, hepatocitos y células musculares, y activa enzimas glucolíticas y lipogénicas (Rosen and Spiegelman, 2006).

Entre estas enzimas destaca la acetil-CoA carboxilasa (ACC), la cual utiliza la energía proveniente de la degradación de la glucosa como sustrato, en forma de acetil-CoA para la síntesis *de novo* de ácidos grasos, especialmente en respuesta a dietas bajas en grasas y ricas en azúcares (Yilmaz et al., 2016). Además, la glucólisis aporta el glicerol para esterificarlo con los ácidos grasos, en forma de glicerol 3 fosfato (G3P) (Yilmaz et al., 2016).

No obstante, con la ingesta de alimentos en la dieta se favorece la lipogénesis postprandial (Yilmaz et al., 2016). En primer lugar, las lipasas del intestino delgado junto con la ayuda de las sales biliares digieren las grasas absorbidas

dando lugar a ácidos grasos y glicerol, que se convierten en TAGs tras su difusión al interior de las células epiteliales de la mucosa intestinal (Yilmaz et al., 2016). Los TAGs se empaquetan con proteínas específicas y el colesterol de la dieta formando quilomicrones, los cuales son hidrolizados por la lipoproteína lipasa (LPL) en el tejido adiposo (Kersten, 2014). En concreto, la LPL presenta un papel clave en la captación de ácidos grasos en los adipocitos (Kersten, 2014). La LPL es secretada por los adipocitos, la cual se transloca al lumen de los capilares del tejido adiposo, liberando los ácidos grasos a partir de la hidrólisis de los TAGs que están siendo transportados por quilomicrones y lipoproteínas de baja densidad en el torrente sanguíneo (Frayn, 2002).

Una vez los quilomicrones alcanzan los tejidos diana, los ácidos grasos liberados por LPL ingresan en los adipocitos mediante dominios específicos de membrana plasmática denominados caveolas (Landstrom et al., 2014), por un proceso regulado por la insulina y en el que intervienen tres tipos de proteínas: i) proteínas de unión a ácidos grasos (*fatty acid binding protein*, FABPs) de la membrana plasmática, como FABP4 y FABP5, ambas FABPs son chaperonas lipídicas que están también presentes en el citosol de los adipocitos, para favorecer el tránsito intracelular de estos compuestos; ii) translocasas de ácidos grasos (*fatty acid translocase*, FAT/CD36); iii) y proteínas de transporte de ácidos grasos (*fatty acid transport protein*, FATP) (Ladeira et al., 2016; Thompson et al., 2010).

Seguidamente, los ácidos grasos son activados por las enzimas acil-CoA sintetasas (ACS) mediante esterificación con coenzima A, y glicerol mediante las enzimas glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT) y sn-1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferasa (AGPAT) del RE, originando ácido fosfatídico. El ácido fosfatídico es el intermediario en la síntesis de TAGs y su conversión en diacilgliceroles (DAGs) está mediada por la enzima ácido fosfatídico fosfatasa (*phosphatidate phosphatase*, PAP/lipin). Sobre los DAGs actúan las enzimas diacilglicerolaciltransferasas (DGAT), siendo DGAT2 la más abundante en adipocitos, transformándolos finalmente en TAGs que se acumulan finalmente en el interior de las GLs de los adipocitos, ocupando la mayor parte de su citoplasma (Haczeyni et al., 2018; Harris et al., 2011; Ladeira et al., 2016;

Rodríguez et al., 2015; Smith et al., 2000; Smith and Kahn, 2016; Thompson et al., 2010; Walther and Farese, 2012).

Por otro lado, en periodos de ayuno se reduce la cantidad de insulina en sangre, lo que conlleva el cese de la lipogénesis y la puesta en marcha del catabolismo mediado por la lipólisis (Carmen and Víctor, 2006). El glicerol y los ácidos grasos liberados por los adipocitos durante este proceso son combustibles oxidativos esenciales para el riñón, el miocardio, el músculo esquelético y el hígado (Carmen and Víctor, 2006). La lipólisis está regulada principalmente por la acción coordinada de dos enzimas lipolíticas, la lipasa sensible a hormonas HSL y la lipasa de TAGs del adipocito (*adipose triglyceride lipase*, ATGL). Además, las catecolaminas liberadas por las inervaciones del sistema nervioso simpático del tejido adiposo (hormonas adrenérgicas como la epinefrina y norepinefrina) también activan la lipólisis. La unión de las catecolaminas con los receptores β -adrenérgicos junto al glucagón inducen la activación de la proteína quinasa A (PKA) dependiente de AMPc (Carmen and Víctor, 2006), la cual fosforila y activa a HSL, que se transloca desde el citosol hasta la superficie de las GLs. Una vez allí, PKA fosforila a una de las proteínas asociadas a las GLs, la perilipina-1 (PLIN1). Esto provoca la liberación de un coactivador de ATGL (*comparative gene identification-58*, CGI58), que hace posible que HSL, ATGL y MGL (monoacilglicerol lipasa) catalicen la hidrólisis de los TAGs intracelulares almacenados en las GLs de los adipocitos (Demine et al., 2018), resultando en la liberación de glicerol y ácidos grasos, los cuales podrían ser transportados a otros tejidos a través del torrente sanguíneo, para su uso como fuente de energía en periodos de ayuno (Guilherme et al., 2008; Malagon et al., 2014; Rodríguez et al., 2015; Tang and Lane, 2012). En concreto, ATGL cataliza la conversión de TAGs a DAGs y monoacilgliceroles (MAGs); HSL hidroliza DAGs a MAGs; y MGL descompone los MAGs en ácidos grasos libres y glicerol (Lampidonis et al., 2011).

1.5. Gotas lipídicas

Las GLs han sido tradicionalmente consideradas como estructuras inertes y complejas, pero actualmente se consideran orgánulos celulares dinámicos conservados evolutivamente, que están presentes de forma ubicua en las

células. No sólo sirven para el almacenamiento y suministro de lípidos a la célula (la cual es su principal función), sino que también sirven como plataformas para la defensa celular contra patógenos (Bosch et al., 2020; Melo and Dvorak, 2012), el tráfico de lípidos, la síntesis de membranas y la degradación de proteínas (Olzmann et al., 2013; Vanni, 2017; Walther and Farese, 2012; Yang et al., 2012). Las GLs se pueden localizar en cualquier tipo celular, aunque son abundantes en los adipocitos y en las células productoras de esteroides (Tauchi-Sato et al., 2002). Tienen forma redondeada y su tamaño difiere notablemente en distintos tipos celulares o entre células individuales de una misma población. Existen células que tienen GLs pequeñas con diámetros de 100 a 200 nm, mientras que los adipocitos blancos maduros presentan GLs con diámetros de hasta 100 μ m en obesos, y ocupan la práctica totalidad del volumen celular (Meyers et al., 2017; Walther and Farese, 2012). Además, en respuesta a señales celulares pueden crecer o disminuir de tamaño rápidamente (Walther and Farese, 2012; Wilfling et al., 2014a, 2014b). Aunque morfológicamente son diversas, todas las GLs tienen una estructura similar que las diferencia del resto de orgánulos. Las GLs tienen una estructura micelar constituida por un núcleo hidrofóbico empaquetado de lípidos neutros, entre los que predominan ésteres de esteroides (p.ej. colesterol), DAGs, TAGs y ácidos grasos no esterificados. Este núcleo hidrofóbico está rodeado por una monocapa de fosfolípidos a la que se asocian proteínas específicas integrales y periféricas (Barbosa and Siniossoglou, 2017; Gross and Silver, 2014; Kuerschner et al., 2008; Sztalryd and Brasaemle, 2017; Tauchi-Sato et al., 2002; Thiam and Dugail, 2019; Walther and Farese, 2012). El almacenamiento excesivo o deficiente de estos lípidos neutros puede ocasionar enfermedades como la aterosclerosis, lipodistrofia, esteatosis hepática, obesidad y DM2 (Kory et al., 2016).

1.5.1. Biogénesis de gotas lipídicas

Actualmente se acepta que la formación de nuevas GLs se produce mediante la acumulación de lípidos neutros esterificados entre las dos hemicapas de la bicapa lipídica de regiones concretas del RE, que finalmente geman a partir de este compartimento formando las GLs nacientes.

Las GLs recién formadas pueden: i) aumentar de tamaño por síntesis de TAGs en la propia GL, mediante la acción de enzimas asociadas a su superficie, o mediante la fusión de GLs de menor tamaño gemadas del RE (Barbosa and Siniosoglou, 2017; Kory et al., 2016; Walther and Farese, 2012); ii) o disminuir de tamaño (por fisión de GLs o lipólisis) en función de los requerimientos energéticos celulares (Walther and Farese, 2012).

1.5.2. Proteoma de la cubierta de la gota lipídica

En la superficie de las GLs, se ubican proteínas entre las que destacan las que funcionan como enzimas en procesos de lipogénesis (p.ej., DGAT2) y lipólisis (p.ej., ATGL y HSL), proteínas estructurales (como las de la familia de las PLINs) y las familias de proteínas llamadas *cell death-inducing DFFA-like effector* (CIDE, las cuales regulan la formación, crecimiento y mantenimiento de GLs) (Kimmel and Sztalryd, 2016; Kory et al., 2016; Sztalryd and Brasaemle, 2017; Walther and Farese, 2012). Además, las GLs también presentan proteínas relacionadas con el tráfico intracelular de membranas (como las de la familia Rab GTPasa) (Guzmán-Ruiz et al., 2020; Li and Yu, 2016) y/o con la interacción de GLs con otros orgánulos, tales como Rab y *ADP-ribosylation factor* (ARF) GTPasas, y proteínas *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment proteins receptor* (SNARE) (Kimmel and Sztalryd, 2016; Kory et al., 2016; Walther and Farese, 2012), lo que indica que este orgánulo tiene una comunicación extensa con el resto de compartimentos intracelulares (Li and Yu, 2016). Además, de ellas, se conocen muchas otras proteínas que se unen a la superficie de las GLs. Entre ellas destacan ACSL3, responsable de la activación de los ácidos grasos, ACSL3, y otras que completan la ruta de síntesis de TAGs (GPAT4, AGPAT3, DGAT2) (Wilfling et al., 2013).

Más recientemente, se ha demostrado que las GLs pueden servir como plataformas de plegamiento molecular y asociarse con componentes del sistema ubiquitina-proteasoma para mantener el recambio de proteínas de GLs (Bersuker and Olzmann, 2017; Kory et al., 2016, 2015; Sánchez-Álvarez et al., 2022; Wilfling et al., 2014b).

1.5.3. Tráfico de proteínas a la cubierta de la gota lipídica

A pesar del conocimiento adquirido sobre la composición proteica de la cubierta de las GLs, los mecanismos y las rutas intracelulares por las cuales las proteínas se dirigen a la superficie de la GL aún no se comprenden completamente (Song et al., 2022).

Se han identificado diferentes proteínas asociadas a GLs que participan en procesos de tráfico intracelular y en la fusión de membranas, lo que ha llevado a la consideración de estos orgánulos como importantes componentes del tráfico intracelular (Vanni, 2017). Entre estas proteínas se encuentran las ya mencionadas GTPasas de bajo peso molecular, como las proteínas Rab, los factores v-SNARE y t-SNARE y proteínas motoras del citoesqueleto (Meyers et al., 2017; Wickner W, 2008). En este sentido, se han identificado dominios peptídicos conservados en proteínas de la monocapa de la GL, que podrían colaborar en el direccionamiento y anclaje de proteínas a dicho orgánulo, como son las hélices anfipáticas (Rowe et al., 2016) y las horquillas y parches hidrofóbicas (Ingelmo-Torres et al., 2009).

También se ha demostrado la formación de puentes entre el RE y la GL que permiten el intercambio de lípidos y proteínas entre ambos compartimentos (Jacquier et al., 2011). Éstos dependen de la maquinaria ARF1/COPI (Kory et al., 2016; Wilfling et al., 2014b), aunque la vía COPI también puede dirigir proteínas a las GLs mediante transporte vesicular (coatómeros COPI) (Barbosa and Siniossoglou, 2017; Kory et al., 2016; Walther and Farese, 2012). En cualquier caso, parece que estos mecanismos de transferencia de proteínas (y lípidos) del RE a las GLs podrían ocurrir en los ERES (Walther and Farese, 2012).

1.5.4. Contacto de gotas lipídicas con otros orgánulos

Una de las principales características de las células eucariotas es la capacidad de compartimentación celular como ventaja para llevar a cabo determinadas reacciones bioquímicas en localizaciones subcelulares y momentos específicos (Cohen et al., 2018). Esta compartimentación se traduce en la presencia de diversos orgánulos, capaces de realizar ciertas funciones de forma individual,

pero que necesitan estar en contacto entre ellos para completar rutas bioquímicas y procesos que dependen del intercambio de metabolitos entre distintos orgánulos (Cohen et al., 2018). Estos contactos se producen en las regiones conocidas como MCSs (Cohen et al., 2018).

El hallazgo de proteínas de tráfico de membranas en las GLs (como las de la familia Rab GTPasa) postuló que este orgánulo podría tener una comunicación extensa con el resto de compartimentos intracelulares (Li and Yu, 2016). Recientemente se ha demostrado que las GLs no funcionan de manera aislada, sino que pueden interaccionar físicamente entre sí y con otros orgánulos celulares, como el RE, las mitocondrias, los peroxisomas, los lisosomas, los endosomas y el núcleo (Barbosa and Siniosoglou, 2017; Kory et al., 2016; Olzmann and Carvalho, 2018; Walther and Farese, 2012). Estos puntos de contacto impiden que los lípidos circulen libremente en el interior celular, lo que provocaría lipotoxicidad y estrés oxidativo (Wilfling et al., 2014b).

Entre estos contactos es de especial interés el del RE con las GLs, ya que éstas se forman a partir de este orgánulo, y durante el crecimiento y maduración de estas, ambos orgánulos mantienen un estrecho contacto (Henne et al., 2020). Las GLs recién formadas pueden permanecer unidas al RE de forma constante por puentes membranosos, los cuales permiten el transporte de lípidos y proteínas entre ellos como se comentó anteriormente, o pueden separarse del RE y aceptar proteínas provenientes de este orgánulo mediante transporte vesicular (Barbosa et al., 2015; Jacquier et al., 2011; Kory et al., 2016; Walther and Farese, 2012). Además, las GLs maduras y gemadas de RE pueden volver a contactar con el RE para la transferencia tardía de proteínas y lípidos que colaboren en el mantenimiento de la homeostasis lipídica (Song et al., 2022; Walther and Farese, 2012) (**Fig. 1**), en un proceso que requiere del complejo COPI/ARF1 (Wilfling et al., 2014b).

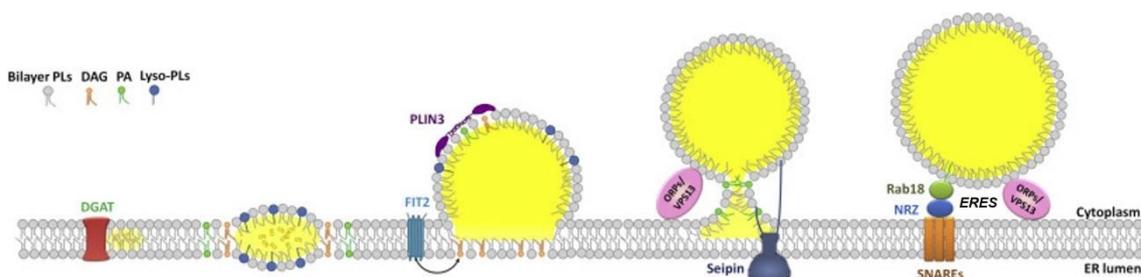


Figura 1. Gemación de GLs, y su posterior contacto con RE, que permite la transferencia tardía de proteínas. Se muestra el ejemplo de Rab18 como proteína que se une a la GL gemada y madura en la intersección RE-GL, en células de mamífero y levaduras. *PLs: phospholipids; PA: phosphatidic acid; Lyso-PLs: lysophospholipids* (Gao et al., 2019).

En el caso de la adipogénesis, es necesaria la interacción de las mitocondrias con las GLs, lo que supone que ambos orgánulos deben crecer para un correcto desarrollo del proceso (Yang et al., 2014). Los peroxisomas sin embargo, tienden a mantener su tamaño durante la adipogénesis (van der Zand et al., 2006).

Además, para llevar a cabo las funciones de acumulación y movilización de TAGs, el adipocito requiere que sus orgánulos interaccionen entre ellos y con las GLs. (Schrader et al., 2020). Destaca que, para la oxidación de los ácidos grasos, los TAGs de las GLs deben pasar a ácidos grasos libres a través de las enzimas ATGL, HSL y MGL, secuencialmente, como se explicó con anterioridad (Schrader et al., 2020). Así, para la translocación de los ácidos grasos libres, las GLs entran en contacto con las mitocondrias donde se producirá la β -oxidación (Schrader et al., 2020). Las GLs también pueden interaccionar con los peroxisomas para producir la β -oxidación de ciertos lípidos, además pueden transferirse lípidos hacia el peroxisoma para la síntesis de plasmalógenos en situaciones estresantes para la célula (Schrader et al., 2020). En este sentido el peroxisoma también establece contactos con el RE dado que los últimos pasos de la síntesis de plasmalógenos se producen en el RE, y que la formación de vesículas pre-peroxisomales (que posteriormente se fusionan para dar lugar a peroxisomas) geman de este orgánulo (Barbosa et al., 2015; Schrader et al., 2020).

Se ha descrito que la obesidad se asocia con una alteración de la función de varios orgánulos clave como el RE y las mitocondrias, que sufren estrés/fragmentación de RE y estrés oxidativo, respectivamente. Esto provoca una disrupción de los contactos entre el RE y las mitocondrias (Simmen and Tagaya, 2017), y, secundariamente una alteración del contacto RE-GL, lo que colabora en la acumulación ectópica de ácidos grasos (Schrader et al., 2020), así como entre peroxisoma y RE, necesarios para la síntesis de plasmalógenos (Schrader et al., 2020).

Estos plasmalógenos son sintetizados en el peroxisoma, a partir de ácidos grasos que pueden provenir de las reservas de TAGs de las GLs (Braverman and Moser, 2012). Una vez los ácidos grasos llegan al peroxisoma y son procesados por las enzimas gliceronafofosfato-o-acil transferasa (GNPAT) y alquilglicerona fosfato sintetasa (AGPS) de la matriz del peroxisoma que se translocan a la membrana del orgánulo para este fin produciendo preplasmalógenos (Braverman and Moser, 2012). Posteriormente estos preplasmalógenos son translocados a la membrana del RE, formándose un contacto RE-peroxisoma, y se llevan a cabo una serie de modificaciones consecutivas hasta que se obtienen los plasmalógenos, con capacidad antioxidante (Braverman and Moser, 2012).

Se ha reportado que algunas proteínas identificadas en zonas de contacto entre las GLs y otros orgánulos (p.ej., RE, mitocondrias y peroxisomas) son cruciales para la interacción entre éstos (Heid et al., 2014). La mayoría de ellos pueden presentar conexiones temporales entre sí, mediante MCSs (Phillips and Voeltz, 2016). Para ello, los estudios más recientes de MCSs se enfocan en: i) la caracterización por imagen de esas zonas de contacto (composición molecular, cantidad y tamaño de los contactos entre cada orgánulo) que permitan establecer perfiles propios de condiciones de salud y enfermedad; y ii) la posibilidad de generar patrones que puedan proporcionar hipótesis fisiopatológicas que puedan ser posteriormente contrastadas con técnicas de Biología Molecular, y que puedan ser clave para el diagnóstico de las enfermedades (Castro et al., 2018; Valm et al., 2017).

Así, mediante microscopía se ha estudiado la interacción que establece el RE con las GLs y el resto de orgánulos (Walther and Farese, 2012). La conexión existente entre estos dos orgánulos, RE y GL, se debe a que el RE es el lugar de biogénesis de las GLs, y el principal transmisor de lípidos y proteínas a la GL que regulan su metabolismo (Walther and Farese, 2012). Para que este transporte de lípidos y proteínas se lleve a cabo, el contacto RE-GL requiere continuidad entre las membranas de ambos orgánulos, dado el carácter hidrofóbico del material a transferir (Simmen and Tagaya, 2017; Walther and Farese, 2012). Además, el RE puede encargarse del almacenamiento de gran parte del Ca^{2+} y la síntesis de proteínas, así como sus modificaciones

postraduccionales (p. ej., glucosilación y lipidación) y su correcto plegamiento (Abdullahi et al., 2017; Oakes and Papa, 2015). Para ello, en el RE se encuentran chaperonas y enzimas implicadas en procesos de plegamiento proteico, ubiquitinación, lipogénesis, glucosilación y oxidorreducción (Abdullahi et al., 2017; Oakes and Papa, 2015). Por último, algunas de las proteínas producidas en el RE pueden ser secretadas (Abdullahi et al., 2017; Oakes and Papa, 2015).

En determinadas situaciones, la capacidad del RE para procesar la maduración y el plegamiento de las proteínas puede verse sobrepasada, poniéndose en marcha el proceso denominado estrés de RE (Oakes and Papa, 2015; Özcan et al., 2004). Algunas causas conocidas que provocan estrés de RE y que son características de condiciones de obesidad y síndrome metabólico son: exceso de proteínas incorrectamente plegadas, hipoxia, alta demanda de síntesis de lípidos y proteínas, y la necesidad de metabolizar gran cantidad de nutrientes. El estrés de RE activa una ruta conocida como respuesta a proteínas mal plegadas, cuya función es restablecer la homeostasis del RE (Oakes and Papa, 2015; Özcan et al., 2004).

Si esta ruta de compensación falla, el estrés agudo del RE o el mantenimiento de éste de forma crónica terminan ocasionando la apoptosis del adipocito. (Oakes and Papa, 2015; Özcan et al., 2004). En condiciones de obesidad, los adipocitos son forzados a metabolizar gran cantidad de nutrientes, en un intento de mantener la homeostasis energética y metabólica en el organismo mediante la síntesis de grandes cantidades de proteínas y lípidos (Oakes and Papa, 2015; Özcan et al., 2004). El estrés del RE inducido por la obesidad genera un desbalance de la homeostasis metabólica, conduciendo a patologías como IR, DM2, enfermedades cardiovasculares, esteatosis hepática e inflamación del tejido adiposo y otras localizaciones circundantes, como consecuencia de un aumento de expresión de TNF α (Oakes and Papa, 2015; Özcan et al., 2004). En definitiva, el estrés de RE está estrechamente relacionado con el desarrollo del síndrome metabólico (Oakes and Papa, 2015; Özcan et al., 2004).

Las mitocondrias, por su parte, contactan con las GLs para llevar a cabo la oxidación de los ácidos grasos de cadena media y larga a través de la β -oxidación, que permite obtener acetyl-CoA, necesario para producir ATP en condiciones de demanda energética (Walther and Farese, 2012). Además el

contacto GL-mitocondria favorece el transporte de fosfolípidos entre las membranas del RE y las mitocondrias en regiones especializadas del RE, denominadas MAMs (*mitochondria-associated membranes*) (Barbosa et al., 2015; Vance JE, 1990).

Finalmente, los peroxisomas interaccionan con las GLs para realizar la α y β oxidación de los ácidos grasos de cadena muy larga o ramificados (Wanders et al., 2007). Asimismo, los peroxisomas pueden contactar temporalmente con el RE para proporcionarle lípidos pre-plasmalógenos, que serán modificados hasta su estructura final de plasmalógenos por enzimas del RE, adquiriendo su capacidad antioxidante, que principalmente previene la formación de EROs (especies reactivas de oxígeno) y la propagación de la peroxidación lipídica (Barbosa et al., 2015). Estas EROs se creen necesarias para una correcta adipogénesis, aunque su exceso en condiciones de obesidad puede inactivar la ruta de señalización de la insulina, alterando de forma importante el metabolismo celular y del organismo (Liu et al., 2019). Esta relación entre peroxisomas y el correcto desarrollo del tejido adiposo fue descubierta al observar que el número de estos orgánulos aumenta en condiciones lipogénicas (Liu et al., 2019; Lodhi and Semenkovich, 2014). Además, la familia de los PPARs se considera clave para una correcta adipogénesis, lipogénesis y regulación metabólica (Liu et al., 2019; Lodhi and Semenkovich, 2014). En concreto, el receptor PPAR γ es diana para fármacos usados contra la diabetes, las tiazolidinedionas, ya que es imprescindible para la correcta actividad de las funciones mencionadas, así como para regular la sensibilidad a insulina y la producción de adipoquinas, entre otros procesos (Liu et al., 2019; Lodhi and Semenkovich, 2014).

Por todo ello, la conexión de estos orgánulos con la GL resulta fundamental para la formación y crecimiento de ésta, así como para su posterior regulación en función de las necesidades energéticas que demande el organismo. Igualmente, analizar cómo dichos orgánulos se modulan frente a diferentes condiciones (fisiopatológicas) resulta de gran interés para una comprensión mayor del proceso de expansión del adipocito, además de poder aportar nuevos procesos de regulación que podrían ser clave para el tratamiento de la obesidad.

1.6. Proteínas Rab

En las células eucariotas el tráfico intracelular de membrana está regulado por numerosas proteínas entre las que se encuentran la subfamilia de pequeñas GTPasas Rab, que pertenecen a la superfamilia de proteínas Ras (*Rat sarcoma virus*) (Goody et al., 2017). Las proteínas Rab se han conservado evolutivamente y desempeñan diversas funciones celulares como la transducción de señales transmembrana, el tráfico de proteínas y el direccionamiento de vesículas, así como la homeostasis estructural de orgánulos, su interacción o fusión (Sönnichsen et al., 2000).

Además, son fundamentales en el mantenimiento de la fisiología celular debido a las importantes funciones que llevan a cabo (Li and Marlin, 2015). Así, mutaciones o cambios en el nivel de expresión de estas proteínas ocasionan distintas patologías como cáncer, diabetes o enfermedades neurológicas (Li and Marlin, 2015). Por ejemplo, mutaciones en Rab7, Rab23, Rab27, Rab38 y Rab39b conllevan el desarrollo de enfermedades genéticas como el síndrome de Carpenter, retraso mental asociado al cromosoma X o síndrome de Griscelli, entre otros (Li and Marlin, 2015). Por otro lado, se ha comprobado que niveles alterados en la expresión de Rab31 están relacionados con cáncer de mama, pulmón, colon, cerebro, piel y leucemia, mientras que niveles alterados de Rab25 están relacionados con cáncer de mama, colon y ovario (Li and Marlin, 2015).

Las proteínas Rab se encuentran en la membrana plasmática, nuclear y en la de todos los compartimentos intracelulares (endosomas, lisosomas, peroxisomas, RE, mitocondrias, GLs, citoesqueleto y Golgi). En particular, cada una de ellas está más presente en determinados orgánulos y/o dominios de membrana determinados, para regular una ruta de tráfico intracelular de membrana específica (Li and Marlin, 2015; Stenmark, 2009). En concreto, la mayoría de proteínas Rab se unen a sus membranas diana a partir de un dominio hipervariable, el cual se localiza en el extremo C-terminal y ha sido modificado postraduccionalmente mediante la unión covalente de uno o dos grupos isoprenoides geranilgeranilo que permiten dicho anclaje (Ali et al., 2004; Goody et al., 2017; Ka et al., 2007). La reacción de lipidación (también llamada prenilación) por parte de los grupos geranilgeranilo es coordinada por una *Rab escort protein* y una Rab geranilgeranilo transferasa (Gomes et al., 2003).

Con esta asociación las proteínas Rab se vuelven funcionales y actúan como interruptores moleculares, al alternar entre su forma inactiva cuando se localizan en el citosol y están unidas a GDP, y su forma activa cuando se encuentran en la superficie de la membrana/vesícula y están unidas a GTP (Dejgaard and Presley, 2019). La activación de estas GTPasas es llevada a cabo por el *GDP-GTP exchange factor* (GEF), mientras que la desactivación en la membrana diana está catalizada por proteínas activadoras de GTPasas (*GTP-hydrolysis activating proteins*, GAPs) que se encargan de hidrolizar el GTP a GDP (Dejgaard and Presley, 2019; Just and Peränen, 2016; Vetter and Wittinghofer, 2001).

La hidrólisis de GTP y su unión a las proteínas Rab pueden estar afectadas por mutaciones que con frecuencia impiden el transporte correcto de las vesículas (Brasaemle et al., 2004). Se han descrito hasta el momento 70 proteínas Rab en humanos, de las cuales 19 están asociadas a la superficie de las GLs en adipocitos u otros tipos celulares): Rab1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 14, 18, 19, 21, 24, 33, 34, 35, 39 y 41 (Beilstein et al., 2013; Brasaemle et al., 2004; Just and Peränen, 2016; Liu et al., 2004; Martin et al., 2005; Ozeki et al., 2005).

Cada proteína Rab permite la interacción con diferentes efectores, obteniendo de esta manera cierta diversidad funcional en el tráfico intracelular (Barbosa and Siniosoglou, 2017; Christoforidis et al., 1999b; Jean and Kiger, 2012; Kiss and Nilsson, 2014; Laura et al., 2013; Pfeffer, 2017; Semerdjieva et al., 2008). Así, para la clasificación del contenido vesicular (carga) y la formación de cada tipo de vesículas, las proteínas Rab interactúan con determinados adaptadores, como son las quinasas de fosfoinositol y fosfatasas (Christoforidis et al., 1999a; Jean and Kiger, 2012; Laura et al., 2013; Semerdjieva et al., 2008).

Concretamente, las proteínas Rab controlan la biogénesis de vesículas mediante la formación de complejos reguladores que interactúan con las proteínas de cubierta que componen los complejos COPI, COPII y clatrina, contribuyendo en el reclutamiento de las mismas en regiones concretas de la membrana del compartimento donador, en las cuales se producirá la evaginación de la nueva vesícula (Angers and Merz, 2011).

Además, estos complejos de proteínas parecen intervenir en el correcto direccionamiento de las vesículas transportadas hacia su orgánulo diana, debido a su interacción, directa o indirecta, con proteínas motoras, a las cuales reclutan a la superficie vesicular para modular el transporte de vesículas a la membrana aceptora y el movimiento del motor molecular a lo largo del citoesqueleto (Echard et al., 1998; Hume et al., 2001). Posteriormente, las vesículas interactúan con factores de anclaje, acoplamiento o fusión de membranas (Cai et al., 2007; Christoforidis et al., 1999a; Lupashin and Waters, 1997; Lürick et al., 2017). Este último proceso está mediado por la formación de complejos trans-SNARE, formados por la asociación de proteínas v-SNARE y/o t-SNARE, las cuales interactúan con proteínas Rab (Hammer and Wu, 2002). Las proteínas Rab, además, tienen otras funciones no relacionadas con la dinámica vesicular, tales como su actuación como intermediarios en la integración de la señalización celular (Miaczynska et al., 2004).

En definitiva, las proteínas Rab intervienen en la regulación de todas las fases del transporte intracelular de vesículas: desde el momento en que éstas se forman y geman del compartimento donador, hasta su transporte, anclaje y fusión en la membrana diana del compartimento aceptor correspondiente (Zhen and Stenmark, 2015).

Entre las proteínas más representadas en la cubierta de la GL se encuentra la familia Rab de pequeñas GTPasas (Guzmán-Ruiz et al., 2020; Kiss and Nilsson, 2014). Su presencia en las GL aisladas de diferentes tipos celulares, ha sido ampliamente descrita por varios estudios proteómicos (Beilstein et al., 2013; Zhang and Liu, 2019). Atendiendo a su estructura y localización intracelular, y a la información sobre otras proteínas de la cubierta de las GLs (Walther and Farese, 2012), las proteínas Rab podrían dirigirse a la GL de múltiples maneras: por translocación citosol-GL, por difusión desde el RE hasta la GL o incluso interactuando con proteínas ya unidas a las GLs. En este contexto, se ha observado que para direccionar proteínas a las GLs y anclarse a la superficie de la misma, las proteínas conservan determinados patrones estructurales (mencionados anteriormente), que colaboran en su anclaje a las GLs.

La proteína Rab18 es la proteína Rab asociada a GL mejor caracterizada hasta la fecha en adipocitos. Se asocia a las GLs en respuesta a estímulos lipogénicos

inducidos por insulina o lipolíticos inducidos por activación de receptores β -adrenérgicos (Martin et al., 2005; Ozeki et al., 2005; Pulido et al., 2012, 2011). Recientemente, nuestro grupo también encontró la GTPasa Rab34 presente en el proteoma de GL (Guzmán-Ruiz et al., 2020), y su caracterización ha sido uno de los principales objetivos de este trabajo.

1.6.1. Rab18

Algunas proteínas Rab que se asocian a GL juegan un papel importante en el almacenamiento y movilización de lípidos (Kiss and Nilsson, 2014). Este es el caso de Rab18, que interactúa con complejos SNARE en el RE para regular la biogénesis de GL en adipocitos (Dejgaard et al., 2008; Gerondopoulos et al., 2014; Gronemeyer et al., 2013; Pulido et al., 2012, 2011; Xu et al., 2018).

Además, estudios de nuestro laboratorio han mostrado que Rab18 promueve el contacto RE-GL en adipocitos 3T3-L1 (Pulido et al., 2011). Estos resultados, junto con el hallazgo de niveles de expresión de Rab18 incrementados en adipocitos de individuos con obesidad apoyan un papel para esta GTPasa en la regulación de la homeostasis lipídica tanto bajo condiciones fisiológicas como patológicas (Pulido et al., 2012, 2011). En esta línea, la señalización disfuncional de proteínas Rab debida a cambios en las propias proteínas Rab o en proteínas que interaccionan con proteínas Rab ha sido asociada con varias enfermedades tales como el cáncer y las enfermedades neurodegenerativas (Banworth and Li, 2018).

Debido a su capacidad de insertarse en membranas, Rab18 se ha relacionado con el mantenimiento de la estructura del RE, para procesos de amarraje y fusión de vesículas junto a otras proteínas, y para la unión de GLs al RE (Dejgaard and Presley, 2019). En particular, Rab18 se ha identificado asociado a RE una vez se ha activado por el complejo Rab3GAP, también presente en este orgánulo (Gerondopoulos et al., 2014; Just and Peränen, 2016). Sin embargo, mientras que Rab3GAP permanece en subdominios de RE concretos, los ERES, Rab18 no se encuentra restringido a esta zona, sino que puede localizarse por varios puntos de la ruta de secreción regulada.

La función biológica de Rab18 en los ERES se atribuye a su participación en la formación de GLs y en la transferencia de proteínas y lípidos a estos orgánulos (Xu et al., 2018). El modelo propuesto para la participación de Rab18 en el anclaje RE-GL a través de los ERES implica al complejo NRZ (NAG-RINT1-ZW10) y a proteínas de anclaje membranosas SNARE. Posteriormente se formaría el puente membranosos por la fusión de la monocapa de la GL y la bicapa del RE (Dejgaard and Presley, 2019).

La presencia de Rab18 también ha sido descrita en Golgi, endosomas y peroxisomas (Gronemeyer et al., 2013; Just and Peränen, 2016). De la asociación de Rab18 a peroxisomas destaca que la necesidad de continuar en el RE ciertas rutas metabólicas iniciadas en peroxisomas, como la síntesis de plasmalógenos, ha permitido hipotetizar un posible papel para Rab18 en los contactos RE-peroxisomas (Gronemeyer et al., 2013).

1.6.2. Rab34

En 2002, se identificó a la proteína Rab34 por primera vez. Esta GTPasa está formada por 259 aminoácidos, su peso molecular es de 29 kDa, y presenta una alta conservación de secuencia entre especies (Wang and Hong, 2002).

Recientes estudios de proteómica de GLs aisladas de adipocitos diferenciados de la línea celular 3T3-L1 en nuestro grupo de investigación descubrieron por primera vez que Rab34, otro miembro de la familia de proteínas Rab, está presente en la cubierta de la GL de este tipo celular (Guzmán-Ruiz et al., 2020; Pulido et al., 2012). Sin embargo, su función en estas células se desconocía. En este trabajo, parte de nuestros objetivos fueron investigar el tráfico, mecanismos de acción, impacto de Rab34 en la diferenciación adipocitaria (i.e., adipogénesis) y su función en adipocitos, así como desvelar el papel de esta GTPasa en el recambio de lípidos.

Aunque se había demostrado que en el caso de las células HeLa la GTPasa se localiza en el aparato de Golgi (Goldenberg et al., 2007) y lisosomas (Wang and Hong, 2002) estos resultados están en línea con experimentos de inmunocitoquímica y microscopía confocal realizados por nuestro grupo en adipocitos, los cuales también identificaron a la proteína Rab34 en el aparato de

Golgi, pero en etapas tempranas de diferenciación, en concreto hasta el día 3, momento en que las células todavía no han comenzado a almacenar las GLs que caracterizan a este tipo celular. En cambio, en los siguientes días de diferenciación Rab34 se localiza en las nuevas GLs recién formadas (**Fig. 2A, B**) transitando por varios compartimentos intracelulares (**Fig. 2C**). Este resultado sugirió una función para esta GTPasa en la homeostasis de las GLs (posiblemente similar a la de Rab18), relacionado, al menos en parte, con la regulación de la comunicación Golgi-GL.

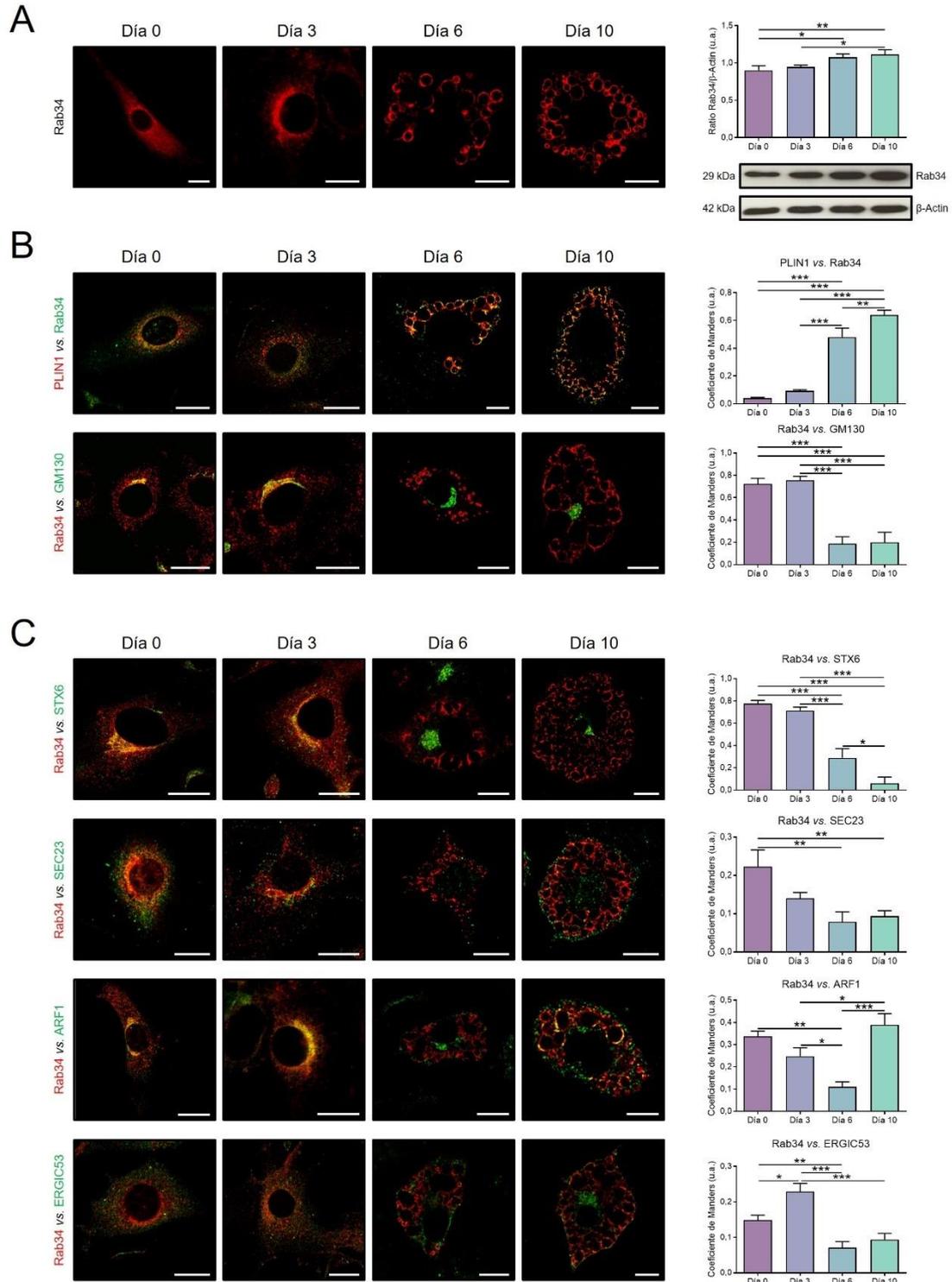


Figura 2. Distribución, expresión y colocalización de Rab34 con marcadores de tráfico intracelular durante la diferenciación de células 3T3-L1 a adipocitos. Imágenes representativas de microscopía confocal de células 3T3-L1 en diferenciación (días 0, 3, 6 y 10) inmunoteñidas para Rab34 (**A**, **B**, **C**) y los marcadores de GL (PLIN1), cara *cis* del aparato de Golgi (GM130) (**B**), cara *trans* del aparato de Golgi (STX6), COPII (SEC23), COPI (ARF1) y ERGIC (ERGIC53) (**C**). (**A**) A la derecha, se muestra el estudio de expresión de Rab34 durante

el proceso de diferenciación de las células 3T3-L1 (n=4 muestras por día de diferenciación). (**B**, **C**) A la derecha se muestran los coeficientes de Manders, que fueron calculados para evaluar la colocalización entre señales (n=12 células por día de diferenciación, 2 estudios replicados). Los datos son expresados como la media \pm SEM. *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001. Barra de escala, 10 μ m.

Entre las funciones conocidas de Rab34 se encuentra su participación en la formación de macropinosomas en células COS-1, en los que colocaliza con las fibras de actina de los lamelipodios (Sun et al., 2003). Asimismo, se ha demostrado que la expresión de Rab34 puede ser inducida en los macrófagos durante una infección bacteriana mediante la activación temprana del factor nuclear kappa B (NF-kB), por lo que podría tener un papel en la respuesta inmune (Gutierrez et al., 2008; Kasmapour et al., 2012). Adicionalmente, Rab34 es capaz de mediar la fusión entre fagosomas y lisosomas/endosomas en macrófagos y células dendríticas, y para ello favorece la biogénesis de los fagolisosomas y el transporte lisosomal hacia éstos (Kasmapour et al., 2012).

Por último, niveles elevados de Rab34 han sido correlacionados con la progresión tumoral del cáncer de próstata, los cuales se recuperaban en presencia de un tratamiento antitumoral (Aakula et al., 2016). Este hallazgo sugiere que Rab34 podría considerarse una diana tumoral en el tratamiento de algunos tipos de cáncer, en los que la obesidad y la desregulación del metabolismo del tejido adiposo tienen una importancia relevante (Aakula et al., 2016). Sin embargo, altos niveles de Rab34 en adipocitos aumentan el número de estructuras del aparato de Golgi y el tamaño de las GLs (**Fig. 3**), lo que refuerza el papel dual de la GTPasa en estos orgánulos, presumiblemente relacionado con el control de la ruta secretora y el almacenamiento de lípidos, respectivamente.

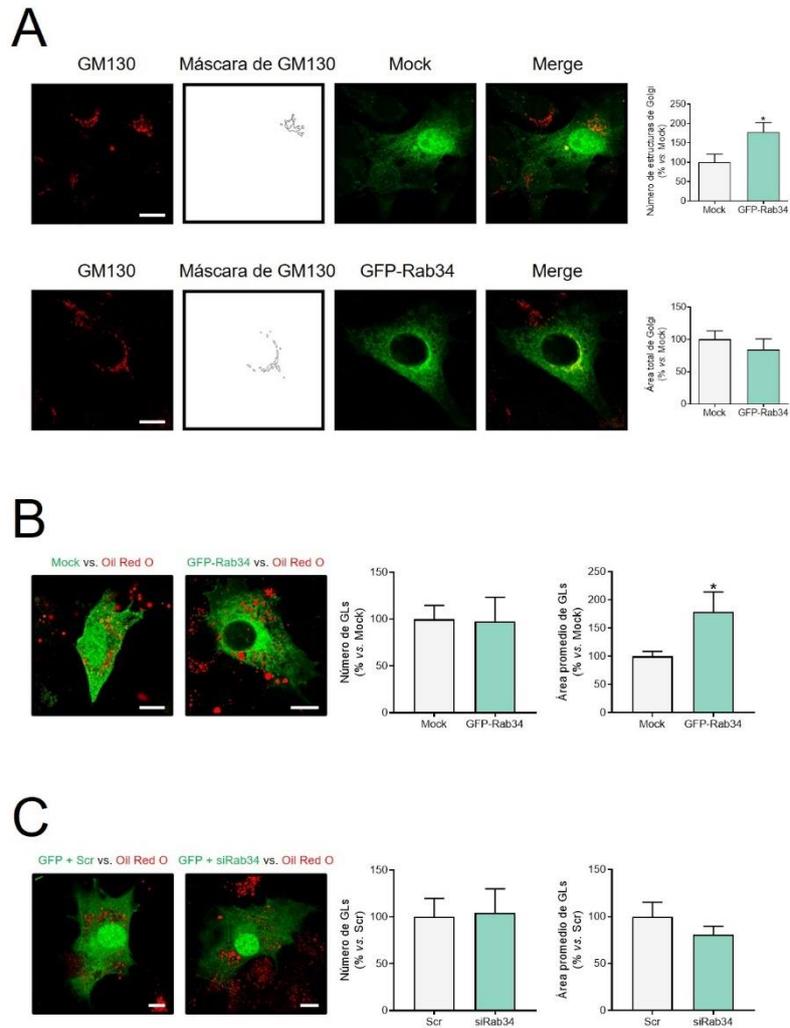


Figura 3. Efectos de la expresión/silenciamiento de Rab34 sobre la organización estructural del aparato de Golgi y/o la GL en adipocitos. Imágenes representativas de células 3T3-L1 transfectadas con los vectores GFP (*Mock*), GFP-Rab34 (**A**, **B**), *Scramble* siRNA (Scr) o Rab34 siRNA (siRab34) (**C**), y teñidas con anti-GM130 (**A**) u *Oil Red O* (**B**, **C**). El análisis morfométrico fue llevado a cabo usando el *software* ImageJ. El número de estructuras medidas y el área total de éstas en las células que expresan o silencian Rab34 es referido a sus correspondientes controles (*Mock/Scr*; 100%). Los datos son expresados como la media \pm SEM ($n=10$ células/condición experimental, 2 estudios replicados). Barra de escala, 10 μ m.

Objetivos

2. OBJETIVOS

PRIMER ESTUDIO:

Rab18 constituye una proteína clave en la interacción de las GLs con el resto de orgánulos y podría suponer una molécula clave en la fisiopatología y el metabolismo lipídico del adipocito. Por ello, en base a lo anteriormente descrito y con el fin de profundizar en la caracterización de Rab18 en relación a su participación en la interacción RE-GL y RE-peroxisoma en adipocitos, en el presente trabajo nos planteamos tres objetivos específicos,

- 1) Determinar los cambios en el patrón de contactos entre los citados orgánulos en condiciones patológicas derivadas de obesidad (i.e., fibrosis, IR e inflamación) mediante microscopía confocal simple o de superresolución, así como las causas que los promueven (integridad del RE, las GLs y los peroxisomas) en adipocitos 3T3-L1
- 2) Estudiar el papel de Rab18 en la formación y mantenimiento de los contactos entre las GLs, el RE y los peroxisomas empleando ensayos proteicos y microscópicos de inmunodetección combinados con técnicas avanzadas de segmentación de imagen celular.

SEGUNDO ESTUDIO:

Sobre la base de la información descrita anteriormente, y con el fin de profundizar en la caracterización funcional de Rab34 en relación a su localización dual en adipocitos (aparato de Golgi-GLs), en el presente trabajo nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- 1) Explorar del tráfico de la proteína Rab34 hasta la superficie de las GLs de adipocitos, durante la diferenciación adipocitaria, empleando estudios de inmunocitoquímica, microscopía confocal y análisis de imagen celular.
- 2) Profundizar en el papel de Rab34 en la GL de adipocitos murinos y humanos, para desvelar el mecanismo de acción de la GTPasa en relación a la regulación del metabolismo lipídico. Para ello se utilizaron ensayos de expresión proteica y génica, microscópicos, metabólicos y de interacción proteica.

Materiales y Métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cultivos celulares

Los fibroblastos aislados de embrión de ratón, i.e., las células 3T3-L1 (ATCC, Manassas, VA, EE.UU.), fueron diferenciados a adipocitos de acuerdo con nuestros protocolos estándar (Moreno-Castellanos et al., 2017; Pulido et al., 2011). Brevemente, las células fueron sembradas en placas de 3,5 o 15 cm de diámetro, con o sin cubreobjetos, a una densidad de 1800 células/cm² y diferenciadas cuando fue necesario con *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (*fetal bovine serum*, FBS) al 10% v/v, 0,5 mmol/L de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), 0,25 mmol/L de dexametasona, y 10 µg/mL de insulina durante 3 días (hasta día 3, D3). Posteriormente, el medio fue reemplazado por DMEM con 10% v/v de FBS y 10 mg/mL de insulina, y las células incubadas por un periodo adicional de 3 días (hasta D6). Finalmente, el medio fue reemplazado por DMEM al 10% v/v FBS cada 3 días hasta el D10 de diferenciación. Las células y los medios de cultivo fueron recogidos en diferentes días de diferenciación y/o después de los tratamientos experimentales. Para los experimentos de cultivos celulares en 3D, las células 3T3-L1 fueron cultivadas y diferenciadas en microgeles 3D basados en colágeno tipo I (COL-I) mediante nuestros protocolos preestablecidos (Guzmán-Ruiz et al., 2020) (ver sección 3.7. *Tratamientos experimentales*).

Los adipocitos primarios humanos (adipocitos maduros aislados en fresco y preadipocitos diferenciados *in vitro*) fueron obtenidos de muestras de TAO y TAS procedentes de individuos con obesidad (índice de masa corporal, IMC > 40 kg/m²) sometidos a cirugía bariátrica laparoscópica siguiendo nuestros protocolos estándar (Sánchez-Ceinos et al., 2021). Las muestras de tejido adiposo TAO y TAS fueron obtenidas de la región abdominal de 9 individuos caucásicos (3 hombres y 6 mujeres) sometidos a diversos procedimientos de cirugía bariátrica laparoscópica después de la aprobación del proyecto por parte del comité de ética del Hospital Universitario Reina Sofía (HURS), Córdoba. El estudio fue realizado de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki. Todos los participantes proporcionaron el consentimiento informado. Previamente, los pacientes se sometieron a una evaluación clínica que incluyó:

historial médico, examen físico y análisis de composición corporal. Además, se llevaron a cabo ensayos bioquímicos (**Tabla 1**) como se describió anteriormente (Díaz-Ruiz et al., 2015; Sánchez-Ceinos et al., 2021).

Tabla 1. Características clínicas de los sujetos con obesidad incluidos en el estudio.

n	9
Sexo (hombre/mujer)	3/6
Edad (años)	49 ± 2
Peso (kg)	133,68 ± 7,97
Altura (m)	1,68 ± 0,04
IMC (kg/m ²)	47,24 ± 1,53
Grasa corporal (%)	62,34 ± 2,17
Glucosa (mg/dL)	100,56 ± 12,96
HbA1c (%)	5,57 ± 0,12
Triacilgliceroles (mg/dL)	124,56 ± 18,72
Colesterol total (mg/dL)	144,00 ± 11,46
Colesterol LDL (mg/dL)	76,50 ± 8,62
Colesterol HDL (mg/dL)	38,63 ± 1,77
PCR* (mg/L)	8,49 ± 2,48
AST (UI/L)	23,63 ± 2,40
ALT (UI/L)	30,63 ± 6,61
Ferritina (ng/ml)	144,20 ± 34,18
Hematocrito (%)	40,92 ± 1,63
Hematíes (millón/mm ³)	4,62 ± 0,19
Plaquetas (millón/mm ³)	0,24 ± 0,02

Los datos son representados como la media ± error estándar de la media (SEM). HbA1c, hemoglobina glicada; LDL, *low-density lipoprotein*; HDL, *high-density lipoprotein*; PCR*, Proteína C-reactiva de alta sensibilidad; AST, aspartato aminotransferasa; ALT, alanina aminotransferasa.

Brevemente, después de la digestión del tejido adiposo usando 2 mg/mL de colagenasa (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EE.UU.), la mezcla resultante fue filtrada a través de filtros celulares con un tamaño de poro de 100 µm, para eliminar el tejido no dispersado, y los adipocitos maduros fueron aislados como se describió en (Sánchez-Ceinos et al., 2021). Después de lavar, una mezcla de 35 µL de adipocitos maduros y 35 µL de Matrigel (BD Biosciences, Bedford, MA, EE.UU) fue preparada y rápidamente colocada en un cubreobjetos en el interior de una placa de 3,5 cm de diámetro. La mezcla fue cuidadosamente extendida

sobre la superficie del cubreobjetos e incubada durante 30 min a 37 °C. Luego, 1 mL de medio de dispersión fue añadido a la placa, la cual fue incubada durante 1 h a 37 °C, y lavada con solución salina tamponada (*phosphate-buffered saline*, PBS) antes de que los adipocitos maduros fueran fijados con 4% p/v de paraformaldehído (PFA) (15 min). Con respecto a los preadipocitos, fueron obtenidos y diferenciados *in vitro* como se describió previamente (Sánchez-Ceinos et al., 2021). Brevemente, las células de la FEV fueron sembradas en medio de proliferación de preadipocitos DMEM/F-12 (1:1) suplementado con 8 mmol/L de biotina, 18 mmol/L de ácido D-pantoténico, 100 mmol/L de ascorbato, 1% v/v de penicilina-estreptomina, y 10% v/v de suero de ternero recién nacido (*newborn calf serum*, NCS), y conservadas a 37 °C en una atmósfera humidificada con 95% de aire y 5% CO₂. El medio fue reemplazado cada 48 h hasta alcanzarse la confluencia apropiada. A continuación, las células fueron despegadas con solución de tripsina-EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid*) y cultivadas a 4000 células/cm² durante tres pases para purificar y amplificar el cultivo celular, siguiendo nuestros métodos establecidos (Sánchez-Ceinos et al., 2021). Después, los preadipocitos fueron sembrados sobre cubreobjetos a una densidad de 4000 células/cm² e inducidos a diferenciación adipocitaria. Finalmente, las células fueron fijadas con 4% p/v de PFA (15 min) a D5 y D10 de diferenciación. La inmunotinción de preadipocitos y adipocitos maduros fue llevada a cabo usando nuestros protocolos estándar (ver sección 3.3. *Inmunocitoquímica y microscopía confocal*).

Las células HEK-293 AD (ATCC) procedentes de riñón humano embrionario fueron cultivadas en medio DMEM conteniendo 1 g/L de glucosa y suplementado con 2 mmol/L de L-glutamina, 0,25 µg/mL de solución de gentamicina/anfotericina y 10% v/v de FBS, y mantenidas a 37 °C y 5% CO₂. Para estudios de co-inmunoprecipitación (co-IP), las células fueron sembradas en placas de 15 cm de diámetro a una densidad de 6000 células/cm², y transfectadas cuando alcanzaron el 60% de confluencia.

3. 2. Modelos animales

Se usaron ratones macho *wild-type* (WT) y deficientes en leptina (ob/ob) (C57/BL/6J; de 8 semanas de edad) para los experimentos con animales. Todos los ratones se alojaron en jaulas individuales bajo condiciones controladas de iluminación (ciclos de 12 h de luz/oscuridad), temperatura y humedad. Se les permitió libre acceso al agua y a una dieta estándar de laboratorio (*standard laboratory diet*, STD) (Scientific Animal Food & Engineering, 16% de proteínas, 60% de carbohidratos y 3% de grasa; Scientific Animal Food & Engineering, Bourgogne Franche-Comté, Francia) o dieta alta en grasa (*high fat diet*, HFD) (Research Diets 12492; 60% de calorías procedentes de grasa, 5,24 kcal/g; Research Diets, New Brunswick, NJ, EE.UU) durante 12 semanas (Quiñones et al., 2018). Los animales fueron eutanasiados, y todos los tejidos fueron retirados rápidamente, congelados inmediatamente en hielo seco, y conservados a -80 °C hasta el análisis.

3.3. Inmunocitoquímica y microscopía confocal

Las células 3T3-L1 o (pre)adipocitos humanos fueron fijados en PFA al 4% p/v (15 min), permeabilizados con PBS conteniendo 0,3% p/v de saponina y 1% p/v de albúmina de suero bovina (1 h a temperatura ambiente), y después incubados con los diferentes anticuerpos correspondientes (**Tabla 2**). Posteriormente, se emplearon anticuerpos secundarios conjugados con Alexa Fluor™ 594, solos o en combinación con anticuerpos secundarios conjugados con Alexa Fluor™ 488 y/o Alexa Fluor™ 405. En algunos experimentos, las células fueron contrateñidas con *Oil Red O* (Sigma-Aldrich) (para cuantificación de GLs) o *ER-Tracker* (Invitrogen, Waltham, MA, EE.UU.) (para cuantificación de RE). Las muestras fueron colocadas en portaobjetos con medio de montaje para fluorescencia Dako (Agilent Technologies, Santa Clara, California, EE.UU.) con o sin 1 µg/mL de 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich) para visualizar los núcleos, y se examinaron bajo un microscopio confocal de barrido láser confocal ZEISS *Laser Scanning Microscope* (LSM) 710 (Carl Zeiss AG., Oberkochen, Alemania). Para los estudios de contacto entre orgánulos en condiciones de hiperglucemia-hiperinsulinemia e inflamación se empleó un microscopio confocal de

superresolución de barrido láser confocal Zeiss LSM 880 equipado con sistema Airyscan (Carl Zeiss AG., Oberkochen, Alemania).

Las imágenes confocales fueron procesadas usando el paquete de *software* Huygens Essential (SVI, Hilversum, Países Bajos). La colocalización de las señales fluorescentes fue estimada por determinación del mapa de píxeles superpuestos de los canales (i.e., máscara) usando el plugin *Colocalization Finder* del *software* Fiji/ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EE.UU.), y el coeficiente de Manders usando el plugin *Colocalization Threshold* del mismo *software*. Para los análisis de número y tamaño de contactos/colocalización entre orgánulos, así como distancia entre los mismos se empleó el plugin *DiAna* del *software* Fiji/ImageJ (NIH). Se incluyeron controles negativos sin anticuerpos primarios o secundarios para evaluar la tinción inespecífica.

Tabla 2. Lista de anticuerpos empleados en los estudios de inmunocitoquímica.

Anticuerpo	Especie	Dilución	Suministrado por:	Referencia
PMP70	Conejo	1:250	Novus Biologicals, Littleton, CO, EE.UU.	NBP1-87258
Rab18	Conejo	1:500	Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EE.UU.	SAB4200173
Catalasa	Ratón	1:50	Abcam, Cambridge, Reino Unido	ab16731
Rab34	Conejo	1:500	Abcam, Cambridge, Reino Unido	ab73383
GM130	Ratón	1:500	BD Biosciences, Bedford, MA, EE.UU.	610822
PLIN1	Cobaya	1:1000	Progen, Heidelberg, Alemania	GP29
STX6	Ratón	1:500	BD Biosciences, Bedford, MA, EE.UU.	610635
ARF1	Ratón	1:500	Abcam, Cambridge, Reino Unido	ab2806
ERGIC53	Ratón	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Heilderberg, Alemania	sc-398777
SEC23	Ratón	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Heilderberg, Alemania	sc-12107
SEC16A	Conejo	1:50	Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EE.UU.	HPA005684
FABP5	Ratón	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Heilderberg, Alemania	sc-365166
UBA1	Mouse	1:500	Invitrogen, Carlsbad, CA	67198-1-IG
Anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor™ 594	Burro	1:500	Invitrogen, Waltham, MA, EE.UU.	A-21207
Anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor™ 594	Cabra	1:500	Invitrogen, Waltham, MA, EE.UU.	A-11076
Anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor™ 594	Gallina	1:500	Invitrogen, Waltham, MA, EE.UU.	A-21201

Anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor™ 488	Gallina	1:500	Invitrogen, Waltham, MA, EE.UU.	A-21200
Anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor™ 488	Burro	1:500	Invitrogen, Waltham, MA, EE.UU.	A-21206
Anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor™ 405	Cabra	1:500	Abcam, Cambridge, Reino Unido	ab175678

Referencias y concentraciones optimizadas de los anticuerpos usados en los experimentos de inmunocitoquímica. *Peroxisomal membrane protein 70 KDa* (PMP70). *Cis-golgi matrix protein 130* (GM130). Perilipina-1 (PLIN1). Sintaxina-6 (STX6). *Endoplasmic reticulum (ER)-Golgi intermediate compartment 53 kDa protein* (ERGIC53). *Fatty acid-binding protein 5* (FABP5).

3.4. Vectores de expresión plasmídicos

Los plásmidos codificantes de GFP (*green fluorescent protein*, pEGFP-N1) y ubiquitina unida a HA (hemaglutinina, pHA-ubiquitina) fueron amablemente suministrados por el Dr. M.A. Calzado (IMIBIC, Córdoba). Los plásmidos codificantes de la secuencia de Rab34 silvestre (pEGFP-Rab34-WT), constitutivamente activa (pEGFP-Rab34-Q111L), y constitutivamente inactiva (pEGFP-Rab34-T66N) fueron amablemente suministrados por el Dr. T. Wang (Membrane Biology Laboratory, Institute of Molecular and Cell Biology, Singapur, Singapur). Los plásmidos codificantes de ATGL (pGFP-ATGL) y HSL (pGFP-HSL) fueron amablemente suministrados por el Dr. T. Osumi (Graduate School of Life Science, University of Hyogo, Hyogo, Japón). El plásmido codificante de FABP5 (pFABP5-EGFP) fue amablemente suministrado por el Dr. M. Kaczocha (Stony Brook University, NY, EE.UU.). El plásmido codificante de la ligasa de biotina BirA (pcDNA3.1mycBioID) fue adquirido de Addgene (Cambridge, MA, EE.UU). El plásmido codificante de UBA1 (pCMV3-UBA1-c-Myc) fue adquirido de SiNo Biological (Düsseldorf, Eschborn, Alemania). Los plásmidos codificantes de UCHL3 (*ubiquitin C-terminal hydrolase L3*, pCMV6-UCHL3-c-Myc) e ISG15 (*interferon-stimulated gene/protein 15*, pCMV6-ISG15-c-Myc) fueron adquiridos de OriGene (Rockville, MD, EE.UU.). Otros plásmidos codificantes de Rab34 (pKate-Rab34-WT y pcDNA3.1mycBioID*Rab34) fueron construidos para este trabajo siguiendo nuestros protocolos preestablecidos (Moreno-Castellanos et al., 2017).

3.5. Estudios de expresión y silenciamiento

Para los ensayos de expresión, las células 3T3-L1, HEK-293 AD y los adipocitos humanos fueron transfectados con los correspondientes vectores plasmídicos a 2,5 µg/mL usando una dilución de 7,5:1000 de Lipofectamine 2000 (Invitrogen), y posteriormente cultivados durante 48 h antes de los experimentos. Para los estudios de silenciamiento, las células fueron transfectadas con una dilución 7,5:1000 de *Lipofetamine RNAiMAX* (Invitrogen) y siRNA (*small interfering RNA*) de ratón contra Rab18 (Dharmacon, Lafayette, CO, EE.UU.) (a D6 de diferenciación), siRNA de ratón contra Rab34 (Dharmacon) (a D3 de diferenciación), siRNA de ratón contra UBA1 (Dharmacon) (a D3 de diferenciación), o siRNA control/*scramble* (Scr) (Sigma-Aldrich) a una concentración de 25 nmol/L (a D3/6 de diferenciación). Después, las células fueron mantenidas en cultivo durante 72 h. Al final de los experimentos, las células fueron procesadas para microscopía confocal y/o *immunoblotting* como se indicó en las secciones correspondientes. En otro set de experimentos, las células fueron recogidas en tampón de radioinmunoprecipitación (*radioimmunoprecipitation assay*, RIPA) y la concentración intracelular de TAGs fue determinada usando *Triglyceride Reagent* (Sigma-Aldrich) y *Amplex UltraRed Reagent* (Invitrogen), mientras que los medios de cultivo fueron analizados para evaluar el contenido de glicerol libre usando *Amplex UltraRed Reagent* (Invitrogen) y *Free Glycerol Reagent* (Sigma-Aldrich) como se describió previamente (Pulido et al., 2011).

3.6. Cuantificación de la secreción de adiponectina

La cuantificación por el inmunoensayo *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) de los niveles de adiponectina intracelular y extracelular en las células 3T3-L1 que expresan GFP-Rab34 o están silenciadas para el gen codificante de esta proteína por tratamiento de siRNA Rab34 (siRab34) fue realizada usando el kit *Quantikine ELISA Mouse Adiponectin/Acrp30 Immunoassay* (R&D Systems Europe, Abingdon, Reino Unido) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.7. Tratamientos experimentales

Las células destinadas al modelo experimental 3D de fibrosis fueron incubadas desde el D0 con lumican en tres concentraciones distintas (0-10-30 ng/mL), y se diferenciaron hasta D8 con los medios de diferenciación mencionados anteriormente (ver sección 3.1. *Cultivos celulares*). Específicamente, se preparó una solución de colágeno (3,6 mg/mL) a partir de una solución stock de COL-I (5 mg/mL) [3D Culture collagen (Rat tail), Cultex, Hannover, Alemania] previamente neutralizada y diluida en medio de cultivo manteniendo las siguientes proporciones en relación al volumen de COL-I: 1/4 de DMEM y 1/8 tampón HEPES (0,24 g/L). Por otro lado, se preparó la solución de DMEM que contenía las células 3T3-L1 en suspensión a una determinada densidad de células/mL (recuperadas de los cultivos iniciales a 70-80% de confluencia). En el grupo experimental de lumican, se añadió el proteoglicano (Recombinant Human Lumican, R&D Systems Europe, Abingdon, Reino Unido) a la solución anterior para obtener una concentración final de 10 ng/mL o 30 ng/mL, mientras que la condición control no contuvo lumican. Se añadió un volumen final de 200 µL de matriz por pocillo (se usaron placas de cultivo de 12 pocillos), que se repartieron para cubrir el fondo del pocillo de forma homogénea. Las placas se incubaron a 37 °C, durante 2 h para la gelificación de la matriz de colágeno. Pasado este tiempo, se añadió 1 mL de DMEM/pocillo y las placas se mantuvieron durante 4 días a 37 °C y 5 % de CO₂ para la estabilización de las células. A continuación, se llevó a cabo el proceso de adipogénesis siguiendo el protocolo descrito anteriormente (ver sección 3.1. *Cultivos celulares*), hasta el D8, cambiando el 50% del medio por medio DMEM completo fresco cada 48 h, con 10% FBS y 0, 10, o 30 ng/mL de lumican.

Las células destinadas a los modelos experimentales de HGHI e inflamación (con TNF α), fueron sembradas sobre cubreobjetos de vidrio cuadrados de 18x18 mm (grosor #1½), específicos para el microscopio de superresolución. Al D7 de diferenciación se les retiró el medio de diferenciación y se incubaron en medio de pretratamiento, constituido por DMEM con 1 g/L de glucosa suplementado con solución antibiótica-antimicótica al 1% v/v, L-glutamina (4 mM) y albúmina de suero bovina al 0,5% p/v, durante 2 h a 37 °C con 5% de CO₂. Pasado este tiempo, se retiró el medio de pretratamiento y se añadió el del tratamiento

correspondiente. En concreto, el tratamiento de HGHI constó de DMEM con 4,5 g/L de glucosa suplementado con FBS solución antibiótica-antimicótica al 1% v/v, L-glutamina (4 mM) y albúmina de suero bovina al 0,5% p/v, e insulina (100 mM). Por su parte, el modelo de inflamación inducida por TNF α constó de DMEM con 1 g/L de glucosa suplementado con solución antibiótica-antimicótica al 1% v/v, L-glutamina (4 mM), BSA 0,5% p/v, y TNF α de ratón (Sigma-Aldrich) a 5 nM. Tras añadir el medio de tratamiento para los modelos descritos las células se incubaron durante 24 h a 37 °C con 5% de CO₂ (hasta D8 de diferenciación).

Con objeto de revelar la(s) ruta(s) de tráfico de Rab34 durante la diferenciación adipocitaria, adipocitos 3T3-L1 a D2 y D4 de diferenciación fueron preincubados en medio de cultivo sin suero (2 h) y posteriormente cultivados en la ausencia o presencia de brefeldina A (BFA) (Sigma-Aldrich) (20 μ mol/L) durante 1 h. Después, el medio de tratamiento fue retirado y las células fueron mantenidas en medio de cultivo fresco durante 48 h. Luego fueron procesadas para microscopía confocal.

En otro set de experimentos, las células 3T3-L1 a D5 (para estudios de expresión) o D6 (para estudios de silenciamiento) de diferenciación fueron expuestas a MG132 (Sigma-Aldrich) (10 μ mol/L, 12 h) para los estudios de estabilidad de proteínas. Una vez tratadas, las células fueron recogidas y procesadas para estudios de *immunoblotting* y/o análisis de lipogénesis/lipólisis.

3.8. Immunoblotting

Los extractos de proteína fueron obtenidos de células lisadas en tampón RIPA conteniendo 50 mmol/L de Tris-HCl (pH 7,4), 150 mmol/L de NaCl, 1% v/v de Tritón X-100, 1 mmol/L de EDTA y 1% v/v de cóctel de inhibidores de proteasas: PMSF (*phenylmethylsulfonyl fluoride* 0,1 mM); CLAP, (*chymostatin-leupeptin-antipain-pepstatin*: quimostatina 5 μ g/mL, leupeptina 5 μ g/mL, antipaína 5 μ g/mL y pepstatina 5 μ g/mL); y fosfatasa (*Halt phosphatase inhibitor cocktail*, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Los extractos fueron resuspendidos en tampón de carga 5X (500 mmol/L de Tris-HCl, 7,5% p/v de SDS (*sodium dodecyl-sulfate*), 10 mmol/L de EDTA, 50% p/v de sacarosa, 5% v/v de β -mercaptoetanol, 250 mmol/L de ditioneitol (DTT), y 5 mg/mL de azul de bromofenol, pH 6,8) y

calentados a 97 °C durante 5 min. Para la detección de oligómeros de adiponectina, las muestras de lisado celular fueron mezcladas con tampón de carga no reductor (sin β -mercaptoetanol) conteniendo 500 mmol/L de Tris-HCl, 7,5% p/v de SDS, 10 mmol/L de EDTA, 50% p/v de sacarosa, y 5 mg/mL de azul de bromofenol, pH 6,8.

Las muestras (20-30 μ g) fueron separadas por *SDS-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) y transferidas a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.) como se describió previamente (Moreno-Castellanos et al., 2017; Sánchez-Ceinos et al., 2021). Los anticuerpos primarios (**Tabla 3**) fueron administrados sobre las membranas y éstas incubadas en agitación toda la noche (4 °C). Después, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa correspondientes durante 1 h a temperatura ambiente. La inmunorreacción fue visualizada usando *Clarity Western ECL Substrate* (Bio-Rad Laboratories). β -Actina o Ponceau S (Díaz-Ruiz et al., 2015) fueron usados como controles de carga. El análisis densitométrico de las bandas inmunorreactivas fue llevado a cabo con el *software* Fiji/ImageJ (NIH).

Tabla 3. Lista de anticuerpos empleados en los estudios de *immunoblotting*.

Anticuerpo	Especie	Dilución	Suministrado por:	Referencia
BIP	Ratón	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Heilderberg, Alemania	sc-376768
ARF1	Ratón	1:2500	Abcam, Cambridge, Reino Unido	ab11038
Catalasa	Ratón	1:50	Abcam, Cambridge, Reino Unido	ab16731
CHOP	Ratón	1:1000	Cell Signaling, Danvers, MS, EE.UU.	2895
PERK	Ratón	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Heilderberg, Alemania	sc-377400
p-PERK	Conejo	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Heilderberg, Alemania	sc-32577
Rab34	Conejo	1:2000	Abcam, Cambridge, Reino Unido	ab73383
β -Actina	Ratón	1:10000	Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EE.UU.	A2066
Adiponectina	Ratón	1:1000	Novus Biologicals, Littleton, CO, EE.UU.	NBP2-22450
PPAR- γ	Conejo	1:1000	Cell Signaling, Danvers, MS, EE.UU.	2443
PLIN2	Ratón	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Heilderberg, Alemania	sc-377429
PLIN1	Cobaya	1:2000	Progen, Heidelberg, Alemania	GP29
DGAT2	Cabra	1:1000	Novus Biologicals, Littleton, CO, EE.UU.	NB100-57851
HSL	Conejo	1:1000	Abcam, Cambridge, Reino Unido	ab45422

p-HSL	Conejo	1:750	Cell Signaling, Danvers, MS, EE.UU	4139
ATGL	Conejo	1:1000	Wuhan Huamei Biotech. Co. Ltd., Huamei, China	WH180241
CGI58	Cabra	1:1000	Abcam, Cambridge, Reino Unido	ab59488
FABP4	Conejo	1:1000	Cell Signaling, Danvers, MS, EE.UU.	3544
FABP5	Conejo	1:1000	Cell Signaling, Danvers, MS, USA	39926
c-Myc	Conejo	1:1000	Cell Signaling, MA, USA	2278
GFP	Conejo	1:1000	Abcam, Cambridge, Reino Unido	ab290
UBA1	Ratón	1:5000	Invitrogen, Waltham, MA, EE.UU.	67198-1-IG
HA	Rata	1:1000	Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EE.UU.	11867423001

Referencias y concentraciones optimizadas de los anticuerpos usados en los experimentos de *immunoblotting*. Perilipina-2 (PLIN2). Perilipina-1 (PLIN1).

3.9. Identificación del interactoma de Rab34

Para identificar las proteínas interactoras de Rab34, se emplearon dos técnicas: i) identificación de biotina dependiente de proximidad (BioID) y, ii) inmunoprecipitación de extractos de proteínas de células 3T3-L1 que expresan GFP-Rab34 seguido de análisis de espectrometría de masas (*mass spectrometry*, MS) en tándem (MS/MS).

3.9.1. Estudios de identificación de biotina dependiente de proximidad

La identificación de biotina dependiente de proximidad (BioID) ha sido ampliamente usada para la identificación de candidatos en interacciones proteína-proteína (Roux et al., 2012). Para los estudios de Rab34, las células 3T3-L1 fueron transfectadas a D6 con los vectores plasmídicos c-Myc-BirA (Mock) o c-Myc-BirA-Rab34. Después de 24 h, las células fueron incubadas con medio completo suplementado con 1 µg/mL de doxiciclina y 50 µmol/L de biotina durante otras 24 h. Las células fueron entonces lisadas a 25 °C en 1 mL de tampón de lisis [50 mmol/L de Tris (pH 7,4), 500 mmol/L de NaCl, 0.4% de p/v SDS, 5 mmol/L de EDTA, 1 mmol/L de DTT, y 1% v/v del cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas] y luego sonicadas con 3 pulsos de 10 s, en presencia de 2% v/v de Tritón X-100. A continuación, un volumen igual de 50 mmol/L de

Tris (pH 7,4, 4 °C) fue añadido y se sonicó nuevamente. Las células fueron centrifugadas a 16000 g (4 °C) y el sobrenadante (6 mg de proteína) fue incubado con 6 mg de *Dynabeads [MyOne Streptavidin C1 Dynabeads (Invitrogen)]* toda la noche (4 °C). Las *beads* fueron recogidas y lavadas con 1 mL de tampón de lavado 1 (2% p/v SDS en H₂O) y después, con tampón de lavado 2 (0,1% p/v de deoxicolato de sodio, 1% v/v de Tritón X-100, 500 mmol/L de NaCl, 1 mmol/L de EDTA, y 50 mmol/L de HEPES, pH 7,5, 25 °C), tampón de lavado 3 (250 mmol/L de LiCl, 0,5% v/v de NP-40, 0,5% p/v de deoxicolato de sodio, 1 mmol/L de EDTA, y 10 mmol/L de Tris, pH 8,1, 25 °C), tampón de lavado 4 (50 mmol/L de Tris, pH 7,4 y 50 mmol/L de NaCl, 25 °C), y finalmente, en 50 mmol/L de NH₄HCO₃ (25 °C). Después, las *beads* fueron expuestas a 20 mmol/L de DTT en agitación vertical (30 min, 37 °C) para reducir el contenido de oxígeno en las proteínas. Luego se añadió yodoacetamida a una concentración final de 20 mmol/L y las *beads* fueron incubadas (40 min, 37 °C) en oscuridad y agitación vertical para conseguir la alquilación de proteínas. Finalmente, se añadió tripsina de grado de espectrometría de masas (Promega, *New South Wales*, Australia) en un ratio 1:50 a las muestras, y se incubaron toda la noche a 37 °C, para la digestión en péptidos de las proteínas precipitadas. Finalmente, las *beads* fueron separadas por atracción magnética, y se añadió ácido fórmico (Scharlab, Barcelona) a la solución de péptidos a una concentración de 2% v/v, previo al análisis de MS/MS.

Los péptidos digeridos de cada muestra (4 µg/muestra) fueron separados usando cromatografía de fase reversa. La adquisición de datos fue realizada en un sistema TripleTOF 6600 (Ab Sciex, Framingham, MA, EE.UU). Después del análisis de MS/MS, los archivos de datos fueron procesados usando el *software* ProteinPilot 5.0.1 (Ab Sciex). El parámetro *False discovery rate* (FDR) fue determinado usando un método de ajuste no lineal y sólo aquellos resultados con FDR<1% fueron seleccionados. Además, sólo aquellas proteínas que no estaban presentes en las células transfectadas con Mock fueron consideradas interactoras potenciales de Rab34. Adicionalmente, también se eliminaron las carboxilasas de mamífero biotiniladas endógenamente, histonas nucleares y típicos contaminantes (queratinas, IgGs y enzimas proteolíticas) (Roux et al., 2012).

3.9.2. Estudios de inmunoprecipitación acoplados a MS/MS

Las células 3T3-L1 fueron transfectadas a D6 con los vectores plasmídicos GFP-Rab34 o Mock, y posteriormente los ensayos de inmunoprecipitación fueron llevados a cabo como se describió (Lara-Chica et al., 2022; Moreno-Castellanos et al., 2017). Brevemente, las células fueron lisadas 48 h después de la transfección con tampón de lisis [50 mmol/L de Tris-HCl (pH 7,4), 150 mmol/L de NaCl, 5 mmol/L de EDTA, 1% v/v de Tritón X-100, 1% v/v del cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas]. Después de la incubación con el anticuerpo anti-GFP o anti-IgG (control) toda la noche a 4 °C, los inmunocomplejos fueron capturados mediante el uso de *beads* de proteína G-Sefarosa (GE Healthcare Bio-Sciences, Madrid) durante 2 h a temperatura ambiente. Después de lavar con tampón de lavado [(20 mmol/L de Tris-HCl (pH 7,5), 150 mmol/L de NaCl, 1 mmol/L de EDTA, 1% v/v de Tritón X-100 y 1% v/v del cóctel de inhibidores de fosfatasas], las muestras fueron eluidas y los sobrenadantes resuspendidos en 150 µL de tampón conteniendo 50 mmol/L de Tris-HCl (pH 7,4), 150 mmol/L de NaCl, 1% v/v de Tritón X-100, 1 mmol/L de EDTA, y 1% v/v del cóctel inhibidores de proteasas y fosfatasas.

Las proteínas de las muestras fueron extraídas del tampón usando metanol-cloroformo y el precipitado proteico fue reconstituido en 40 µL de RapiGest (Waters Cromatografía, Barcelona). El contenido de proteína fue evaluado por microfluorimetría usando *Qubit Protein Assay* (Thermo Fisher Scientific) y las proteínas de las muestras fueron doblemente digeridas con la metodología iST (*in-Stage-Tip kit*) usando las enzimas tripsina y Lys-C, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Preomics, Múnich, Alemania). Las muestras (100 ng) fueron cargadas en el sistema *Evotip Pure* (Evosep Biosystems, Odense, Dinamarca) y después analizadas por cromatografía líquida (*liquid chromatography*, LC)-MS/MS (DIAMode/EvosepOne/TIMSTOF-Flex). Seguidamente, las proteínas fueron identificadas y cuantificadas usando el *software* DIA-NN (Demichev et al., 2020).

3.10. Ensayos de co-inmunoprecipitación

Con objeto de determinar la interacción entre Rab34 y las proteínas seleccionadas, bien debido a sus niveles alterados o porque fueron identificadas tanto por BiID como por estudios de inmunoprecipitación acoplados a MS/MS [ATGL; HSL; FABP5; UBA1; UCHL3; ISG15], empleamos un protocolo estándar para estudios de co-IP en células HEK-293 AD transfectadas con los correspondientes vectores de expresión (Lara-Chica et al., 2022; Moreno-Castellanos et al., 2017).

3.11. Extracción de ARN y *Real-Time PCR*

El aislamiento y purificación del ácido ribonucleico (ARN) de células 3T3-L1 fue llevado a cabo como se describió previamente (Guzmán-Ruiz et al., 2020). Se emplearon cebadores específicos de ratón para Rab34 (cebador *forward* 5'-AAGGTCATCGTTGTGGGAGA-3', y cebador *reverse* 5'-GTTGGAGACTGAAGGGGACA-3'), y FABP5 (cebador *forward* 5'-CGAGAGCACAGTGAACACGA-3', y cebador *reverse* 5'-CCATTGCTGGTGCTGGA-3') para los estudios de *real time* (RT)-*polymerase chain reaction* (PCR) usando nuestros protocolos preestablecidos (Guzmán-Ruiz et al., 2020). Las señales específicas fueron normalizadas con el gen constitutivamente expresado que codifica la hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (*hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*, HPRT) (Guzmán-Ruiz et al., 2020). Todas las muestras fueron analizadas por duplicado y los valores promedio fueron calculados.

3.12. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos fueron realizados usando el *software* estadístico GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE.UU.). Antes de cada análisis, se identificaron y eliminaron valores atípicos (*outliers*) usando el método *robust regression and outlier removal* (ROUT) (Q=1%). La distribución normal de variables fue evaluada usando la prueba de Shapiro-Wilk. Las pruebas *one/two-way analysis of variance* (ANOVA), Kruskal-Wallis, t de muestras

independientes/múltiples o de Mann-Whitney fueron usadas cuando fue apropiado. Un análisis estadístico *post-hoc* usando la prueba de Tukey fue llevado a cabo para identificar diferencias significativas entre grupos. Se consideraron significativamente diferentes los valores de $P < 0.05$. Para los ensayos de imagen confocal, se analizaron al menos 6 micrografías de dos experimentos independientes. Para el resto de análisis, al menos tres muestras independientes fueron analizadas. En los pies de figura correspondientes se indican más detalles sobre las réplicas de cada experimento

Resultados

4. RESULTADOS

PRIMER ESTUDIO: Análisis de los sitios de contacto inter-orgánulos en adipocitos normales y disfuncionales usando la pequeña GTPasa, Rab18, como un modelo molecular

4.1. La fibrosis altera la integridad de orgánulos intracelulares en adipocitos 3T3-L1

En primer lugar, se analizó la morfometría de las GLs y la integridad del RE, así como la relación entre ambos orgánulos en adipocitos diferenciados a día 8 (D8) y cultivados en matrices 3D que emulan las condiciones de la matriz presente en pacientes obesos con diferente sensibilidad a la insulina (**Fig. 4A**).

Así, se analizó el tamaño de las GLs, inmunoteñidas con el anticuerpo anti-PLIN1 (señal verde). Como se observa en la **Figura 4B**, la adición de 30 ng/mL de lumican en las matrices condujo de manera significativa a un menor tamaño de las GLs en los adipocitos, sin embargo, no afectó a la cantidad de las mismas, manteniéndose el mismo número de GLs en las distintas condiciones.

Por otro lado, el RE se marcó específicamente con *ER-Tracker* (señal roja) y como se observa en la **Fig. 4B**, el número de estructuras de RE aumentó significativamente en las matrices de Col-I que contenían lumican y de manera dependiente de la concentración (10 y 30 ng/mL). Sin embargo, el tamaño medio de las estructuras de RE disminuyó significativamente en las mismas condiciones, siendo también un efecto dependiente de la dosis de lumican (**Fig. 4B**). Estos resultados sugieren que nuestro modelo de fibrosis ocasiona fragmentación del RE. De hecho, nuestros análisis previos de expresión de BIP (Guzmán-Ruiz et al., 2020), enzima indicadora del estrés del RE (Melo et al., 2022), mostraron un aumento significativo de los niveles de esta proteína en las células tratadas con 10 y 30 ng/mL de lumican (**Fig. 5**).

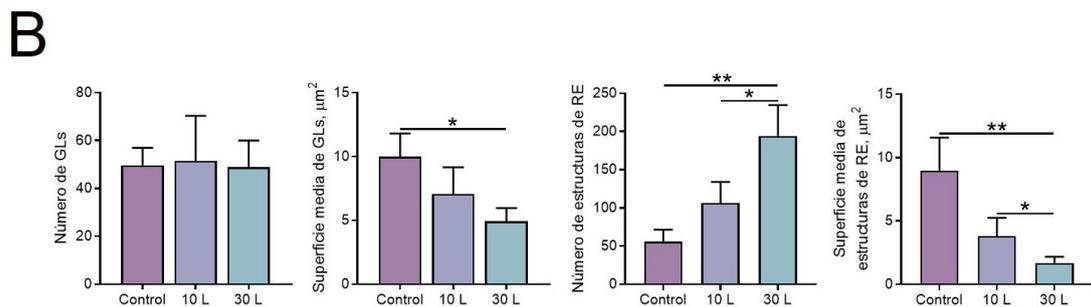
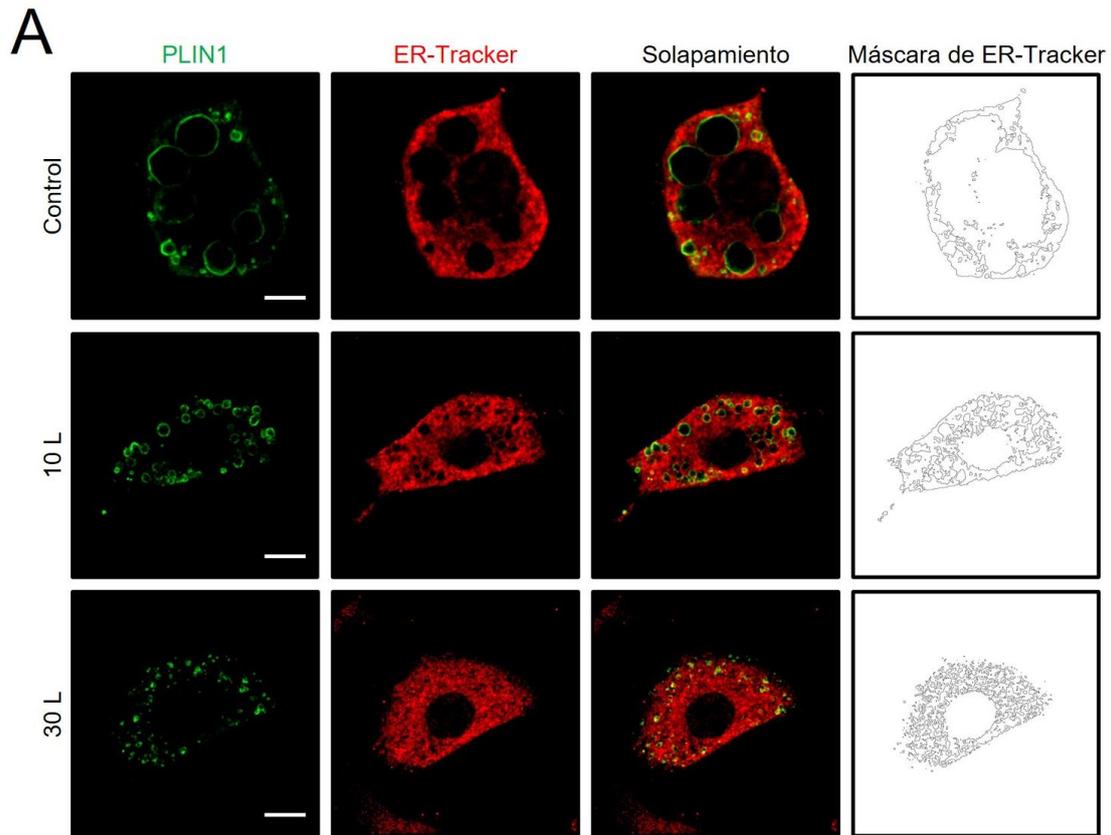


Figura 4. Morfometría de las GLs e integridad del RE en adipocitos en condiciones de fibrosis. (A) Imágenes representativas de microscopía confocal de células 3T3-L1 a D8 de diferenciación, cultivadas en matrices de Col-I en ausencia de lumican (Control, 0 ng/mL de lumican) o en presencia de 10 o 30 ng/mL de lumican (10 L y 30 L, respectivamente). Las células se encuentran teñidas con anti-PLIN1 (verde) y *ER-Tracker* (rojo). (B) Las gráficas muestran la media \pm SEM del número y área promedio (μm^2) de GLs o estructuras de RE por célula. Se analizaron 20 células por condición, de 2 experimentos independientes. Barra de escala, 10 μm . *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$.

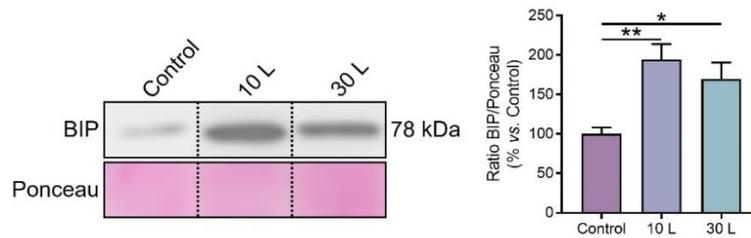


Figura 5. Contenido del factor de estrés de RE, BIP, en adipocitos en condiciones de fibrosis. Se muestra el análisis de *immunoblotting* de la expresión de BIP en adipocitos 3T3-L1 cultivados y diferenciados (D8) en matrices de Col-I (3,6 mg/mL) en ausencia de lumican (Control, 0 ng/mL de lumican) o presencia de 10 o 30 ng/mL de lumican (10 L y 30 L, respectivamente). Se analizaron 18 muestras por condición, de 3 experimentos independientes. * P<0,05; ** P<0,01 (Guzmán-Ruiz et al., 2020).

Por otra parte, y debido a los cambios anteriormente indicados, se analizó el área de contacto entre las GLs y los fragmentos de RE (medido como la superficie media del contacto) y el grado de colocalización entre sus marcadores. Mientras que la superficie de contacto aumentó significativamente en matrices con 10 ng/mL de lumican, la colocalización se incrementó en la condición de 30 ng/mL de lumican respectivamente, pero sin cambiar el número de contactos RE-GL. Dichos resultados parecen evidenciar una disminución de la gemación y del crecimiento de las GLs (**Fig. 6**) en presencia de lumican.

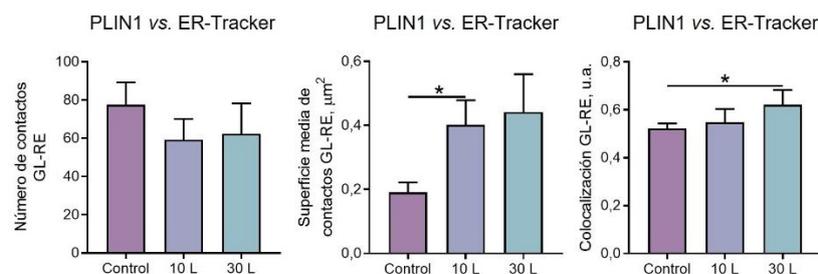


Figura 6. Contacto GL-RE en adipocitos en condiciones de fibrosis. Análisis morfométrico de los contactos GL-RE en células 3T3-L1 a D8 de diferenciación, diferenciadas en matrices de Col-I en ausencia de lumican (Control, 0 ng/mL de lumican) o en presencia de 10 o 30 ng/mL de lumican (10 L y 30 L, respectivamente). Las gráficas muestran la media \pm SEM del número y área promedio (μm^2) de los contactos RE (señal de *ER-Tracker*)-GL (señal de anti-PLIN1), así como el grado de colocalización entre ambos orgánulos, medido con el coeficiente de Manders (u.a.). Se midieron 20 células por condición, de 2 experimentos independientes. *, P<0,05.

Posteriormente, se procedió a caracterizar el efecto del modelo de fibrosis sobre el contenido y tamaño de los peroxisomas, inmunoteñidos para PMP70 (señal verde). En este caso, la concentración más alta de lumican en las matrices disminuyó significativamente el número de peroxisomas por célula sin afectar al tamaño de los mismos (superficie media) (**Fig. 7A**). Además, se caracterizó el perfil de contactos peroxisoma-RE, y se observó una disminución significativa del número de contactos, que se relaciona directamente con la caída del número de peroxisomas que se observa en la mayor concentración de lumican. Aunque no se observaron cambios significativos en el tamaño del contacto peroxisoma-RE, la adición de lumican causó un mayor grado de colocalización entre sus marcadores, siendo solo significativo con la concentración mayor del proteoglicano (**Fig. 7B**).

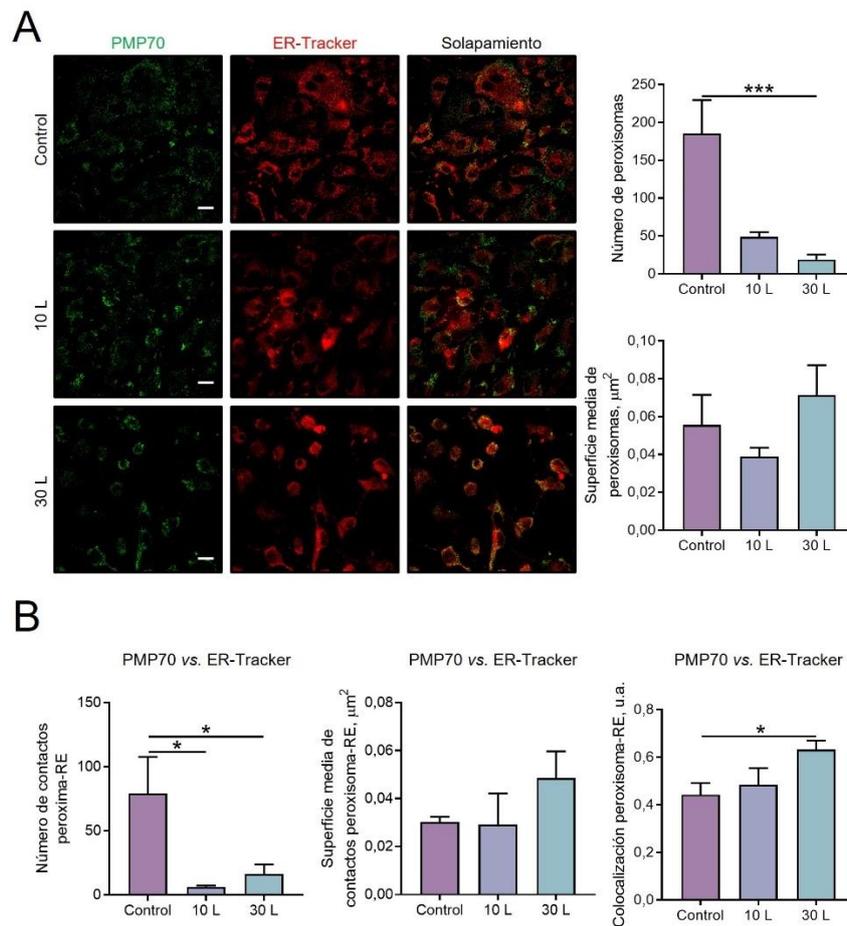


Figura 7. Estructura y contacto peroxisoma-RE en adipocitos en condiciones de fibrosis. (A) Imágenes representativas de microscopía confocal de células 3T3-L1 a D8 de diferenciación, cultivadas en matrices de Col-I en ausencia de lumican (Control, 0 ng/mL de lumican) o en presencia de 10 o 30 ng/mL de lumican (10 L y 30 L, respectivamente). Las células se encuentran teñidas con anti-PMP70 (verde) y *ER-Tracker* (rojo). Las gráficas muestran el número y área

promedio (μm^2) de peroxisomas por célula. **(B)** Análisis morfométrico de los contactos peroxisoma-RE. Las gráficas muestran la media \pm SEM del número y área promedio (μm^2) de los contactos peroxisoma-RE por célula, así como el grado de colocalización entre ambos orgánulos, medido con el coeficiente de Manders (u.a.). Se midieron 8 células de 1 campo por condición, de 2 experimentos independientes. Barra de escala, 10 μm . *, $P < 0,05$; ***, $P < 0,001$.

Estos resultados sostienen la hipótesis de que en adipocitos en condiciones de fibrosis se produce una inhibición parcial de la biogénesis de peroxisomas que puede ser debida a la imposibilidad de separarse del RE.

4.2. El tratamiento crónico de lumican dificulta el acceso de Rab18 a las gotas lipídicas

El impedimento que tienen las GLs y los peroxisomas para separarse de los fragmentos de RE en las condiciones de fibrosis de nuestro modelo, sugiere que las proteínas que utilizan subdominios de RE (ERGIC/ERES) para alcanzar la cubierta de la GL y el peroxisoma podrían ver comprometido su acceso a estos orgánulos. Una de las proteínas clave presente en las GLs y que podría verse afectada por este proceso es la GTPasa Rab18. Esta GTPasa ha sido previamente estudiada en nuestro laboratorio y pudimos comprobar que tiene una función lipogénica/lipolítica en GLs maduras, separadas del RE (Pulido et al., 2011). Recientemente, se ha descrito que está presente en el contacto GL-RE y que está implicada en el aumento de tamaño de las GLs recién formadas y en la transferencia de cargos a ésta, en un proceso dependiente de seipin (Li et al., 2019). Asimismo, resultados previos de nuestro laboratorio han mostrado una disminución de la expresión de seipin en presencia de lumican (Guzmán-Ruiz et al., 2020), por lo que nos dispusimos a analizar la capacidad de Rab18 para acceder a la GL, desde el RE en tales condiciones.

Para ello, realizamos inmunocitoquímicas de triple tinción, para marcar GL (anti-PLIN1, verde), RE (*ER-Tracker*, rojo), y Rab18 (anti-Rab18, magenta), en células 3T3-L1 diferenciadas hasta D8 en las matrices del modelo de fibrosis de obesidad (**Fig. 8**).

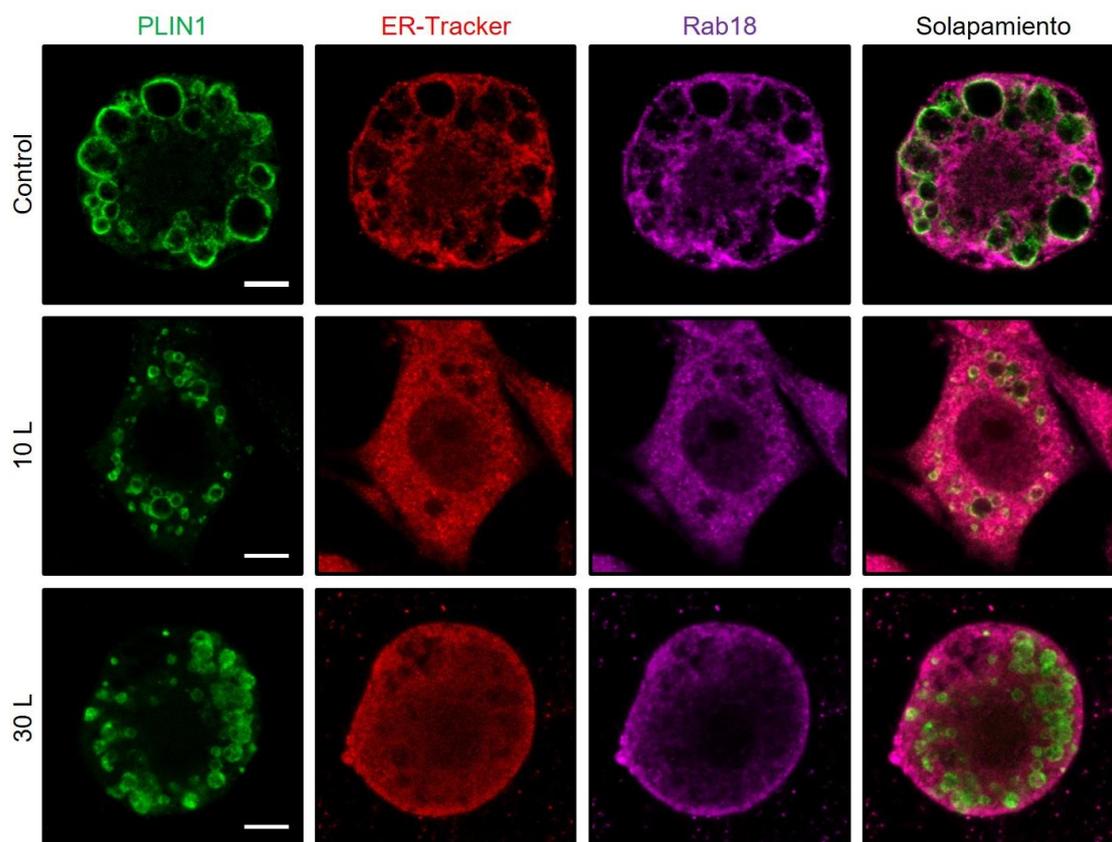


Figura 8. Contacto GL-RE y asociación de Rab18 a ambos orgánulos en adipocitos en condiciones de fibrosis. Imágenes representativas de microscopía confocal de células 3T3-L1 a D8 de diferenciación, diferenciadas en matrices de Col-I en ausencia de lumican (Control, 0 ng/mL de lumican) o en presencia de 10 o 30 ng/mL de lumican (10 L y 30 L, respectivamente). Las células fueron teñidas con anti-PLIN1 (verde), *ER-Tracker* (rojo), y anti-Rab18 (magenta). Se capturaron micrografías de 10 células por condición, de 2 experimentos independientes. Barra de escala, 10 μ m.

A continuación, se estudió el número, área y grado de colocalización de Rab18 con los otros dos marcadores de orgánulos de manera independiente. En cuanto a la interacción Rab18-GL, se observó que el número de colocalizaciones de Rab18-GL fue menor en presencia de concentraciones crecientes de lumican (**Fig. 9**), presumiblemente debido a la menor superficie de las GLs en presencia de lumican. Además, se observó una tendencia moderada del tamaño de las colocalizaciones entre Rab18 y GLs a aumentar, disminuyendo significativamente al grado de colocalización (**Fig. 9**).

En referencia a la interacción Rab18-RE, se observó que el número de colocalizaciones no fue significativamente diferente (**Fig. 9**). Sin embargo, se

observó un aumento muy significativo del tamaño (medido como superficie media) de dichas colocalizaciones Rab18-RE, siendo mayor con dosis elevadas de lumican (**Fig. 9**). Dichos datos coinciden con un mayor grado de colocalización de Rab18-RE, en presencia de lumican (**Fig. 9**).

Estos resultados también van en concordancia con los datos anteriormente obtenidos, que mostraban un mayor fraccionamiento del RE en presencia de concentraciones crecientes de lumican (**Fig. 4B**). Este mayor fraccionamiento, podría explicar en parte que el número de colocalizaciones Rab18-RE no se afecte significativamente, ya que Rab18 aún no se había unido a los pequeños fragmentos de RE más distales al núcleo. De modo que concentraciones crecientes de lumican promoverían un aumento del área de contacto RE-GL en las zonas de RE íntegras, que son las más proximales, donde Rab18 se estaría localizando.

En resumen, los datos de la asociación Rab18-GL junto a los de Rab18-RE sugieren que, si bien Rab18 está accediendo a la GL independientemente de la concentración de lumican, esta translocación está parcialmente impedida, quedándose la GTPasa retenida en los puentes RE-GL, de los que las pequeñas GLs nacientes no se estarían escindiendo totalmente (**Fig. 9**).

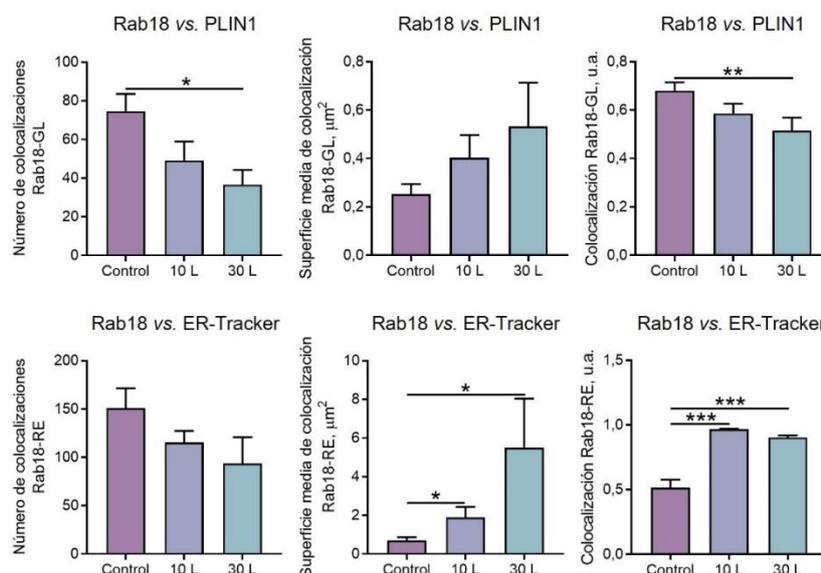


Figura 9. Estudio de colocalización de Rab18 con GLs y RE en adipocitos en condiciones de fibrosis. Análisis morfométrico de la colocalización de Rab18 con GLs o RE, en células 3T3-L1 a D8 de diferenciación, cultivadas en matrices de Col-I en ausencia de lumican (Control, 0 ng/mL de lumican) o en presencia de 10 o 30 ng/mL de lumican (10 L y 30 L, respectivamente).

Las gráficas muestran la media \pm SEM y área promedio (μm^2) de las colocalizaciones GL (señal de PLIN1) y RE (señal de *ER-Tracker*) con Rab18, así como el grado de colocalización entre ambas estructuras, medido con el coeficiente de Manders. Se midieron 18 células por condición, de 2 experimentos independientes. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$.

De hecho, la distribución de frecuencias mostró que las GLs pequeñas, presumiblemente nacientes y unidas al RE, eran más abundantes a mayor concentración de lumican, y que la colocalización Rab18-GL era mayor en las GLs de las células control (separadas del RE en su mayor parte) en casi todos los intervalos de área estudiados. (**Fig. 10**).

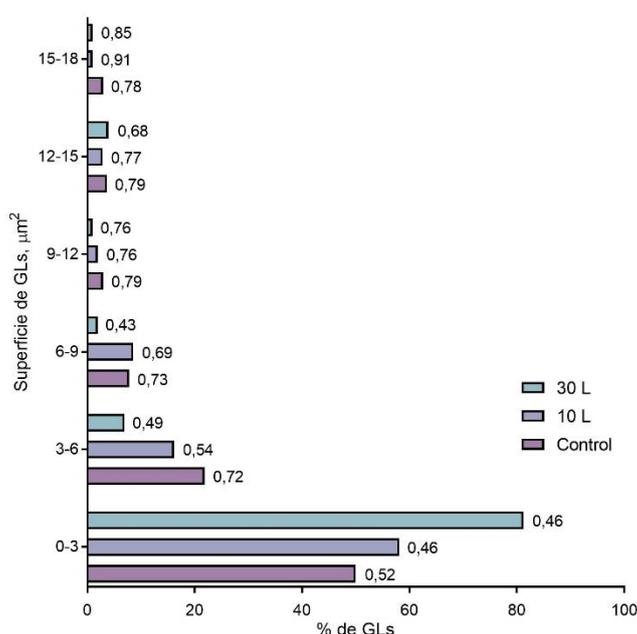


Figura 10. Gráfico de distribución de frecuencias de % de GLs en relación con su superficie y colocalización con Rab18 en adipocitos en condiciones de fibrosis. La longitud de cada barra (eje X) representa el % de GLs presentes en cada condición dentro del intervalo de superficie de GLs (μm^2) señalado (eje Y). A la derecha de cada barra se muestra el coeficiente de Manders entre Rab18 y GL. Las células 3T3-L1 analizadas se diferenciaron hasta D8 en matrices de Col-I en ausencia de lumican (Control, 0 ng/mL de lumican) o en presencia de 10 o 30 ng/mL de lumican (10 L y 30 L, respectivamente). Se midieron 18 células por condición, de 2 experimentos independientes.

Además, el análisis de la inmunocitoquímica triple Rab18-GL-RE demostró que el solapamiento de las tres señales se incrementa conforme aumenta la

concentración de lumican, es decir, Rab18 colocaliza en zonas de GL que están en contacto estrecho con el RE (**Fig. 11**).

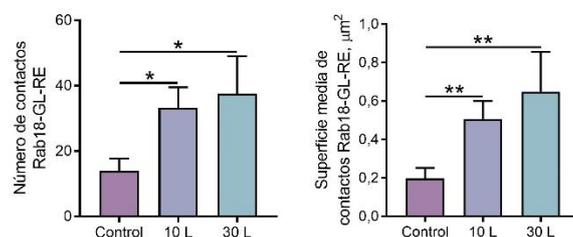


Figura 11. Estudio de los contactos Rab18-GL-RE en fibrosis en adipocitos. Análisis morfométrico del contacto entre las GLs teñidas para Rab18 y PLIN1 (Rab18-GL) y el RE, en células 3T3-L1 a D8 de diferenciación, diferenciadas en matrices de Col-I en ausencia de lumican (Control, 0 ng/mL de lumican) o en presencia de 10 o 30 ng/mL de lumican (10 L y 30 L, respectivamente). Las gráficas muestran la media \pm SEM del número y área promedio (μm^2) de las colocalizaciones entre Rab18, GL (señal de PLIN1) y RE (señal de *ER-Tracker*). Se midieron 18 células por condición, de 2 experimentos independientes. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$.

Finalmente, se observó que la proporción de GLs teñidas para Rab18 en su superficie disminuía en el grupo con la mayor dosis de lumican (**Fig. 12**).

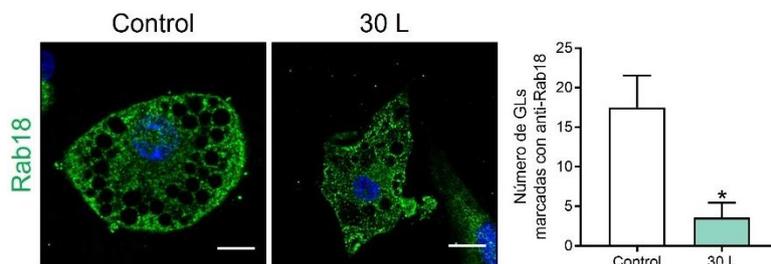


Figura 12. Análisis del contenido de GLs teñidas positivamente para Rab18 en adipocitos en condiciones de fibrosis. Imágenes representativas en ausencia de lumican (Control, 0 ng/mL de lumican) o en presencia de 30 ng/mL de lumican (30 L). Las células 3T3-L1 fueron teñidas con anti-Rab18 (verde). Se capturaron y midieron micrografías de 6 células por condición, de 2 experimentos independientes. Barra de escala, 10 μm . *, $P < 0,05$.

4.3. La insulinoresistencia expande el retículo, asociándose a Rab18

Inicialmente, se analizó el número y área de las GLs y las estructuras de RE en condiciones de IR (modelo celular de HGHI). Posteriormente, para investigar el papel de Rab18 en el contacto GL-RE en estas condiciones, evaluamos el número y tamaño promedio de superficies solapantes, así como el grado de

colocalización entre GL-RE, y posteriormente la localización de Rab18 en estos orgánulos, y estos parámetros se compararon con los de las condiciones basales. Para todo ello, se realizaron estudios de inmunocitoquímica con los mismos marcadores que en el apartado anterior. En particular, se tiñeron adipocitos 3T3-L1 a D8 de diferenciación, expuestos al tratamiento de HGHI durante 24 h. Las GLs fueron marcadas en verde con anti-PLIN1, el RE en rojo con el marcador *in vivo* *ER-Tracker*, y Rab18 en magenta con anti-Rab18. Posteriormente, las células fueron fijadas y observadas al microscopio confocal de superresolución (Fig. 13A).

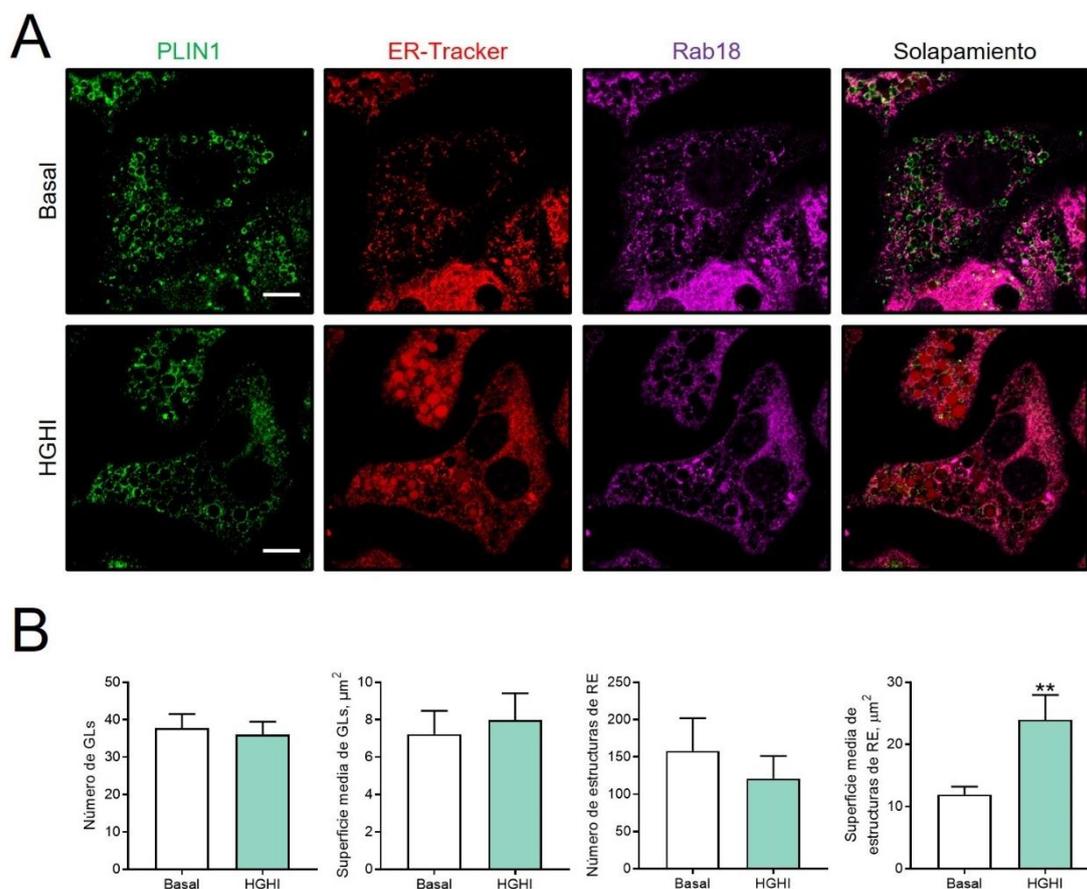


Figura 13. Interacción Rab18-GL-RE y morfometría de GLs y RE en condiciones de HGHI en adipocitos. (A) Imágenes representativas de microscopía confocal de superresolución, de células 3T3-L1 a D8 de diferenciación, en condiciones basales o de HGHI (24 h). Las células fueron teñidas con anti-PLIN1 (verde), *ER-Tracker* (rojo) y anti-Rab18 (magenta). (B) Integridad del RE en condiciones de HGHI en adipocitos. Se capturaron micrografías de 16 células por condición, de 2 experimentos independientes. Las gráficas muestran la media \pm SEM del número y área promedio (μm^2) de GLs o estructuras de RE por célula. Barra de escala, 10 μm . **, $P < 0,01$.

Mientras que el análisis morfométrico de las GLs no mostró variación en su cantidad o tamaño entre ambas condiciones, el de integridad de RE puso de manifiesto que el número de estructuras teñidas para RE no se afecta en condiciones de HGHI, pero que el tamaño de las mismas aumenta significativamente (**Fig. 13B**). Este fenómeno es conocido como expansión del RE y su función ha sido interpretada como un mecanismo de compensación para evitar el daño desencadenado por el estrés de RE, como paso previo a la fragmentación (Khaminets et al., 2015; Kucharz et al., 2011; Subramanian and Meyer, 1997).

Por su parte los experimentos de interacciones mostraron que en los adipocitos a D8 de diferenciación y expuestos a condiciones de HGHI se produce un aumento significativo del grado de colocalización entre GL-RE y entre Rab18-GL (**Fig. 14A**). Del mismo modo, la superficie y el grado de colocalización Rab18-RE fueron significativamente mayores en las células con HGHI (**Fig. 14A**).

Este último resultado sugiere una posible acumulación de Rab18 en dominios específicos del RE en las células en condiciones de HGHI. En este sentido, la GTPasa Rab18, ampliamente estudiada por nuestro laboratorio y en la literatura científica en general, ha sido asociada al RE, especialmente en los denominados ERES, donde se le ha atribuido un papel mecánico en la formación o mantenimiento del contacto con otros orgánulos (especialmente con las GLs) en adipocitos y células mamarias (Jayson et al., 2018; Li et al., 2019), a los que accede mediante estos puntos de contacto.

Para investigar si el tráfico de Rab18 a las GLs se ve afectado por la condición de HGHI en función del tamaño de estos orgánulos se realizó una distribución de frecuencias de GLs por intervalos de área, y se enfrentaron a los coeficientes de colocalización Rab18-GL (**Fig. 14B**).

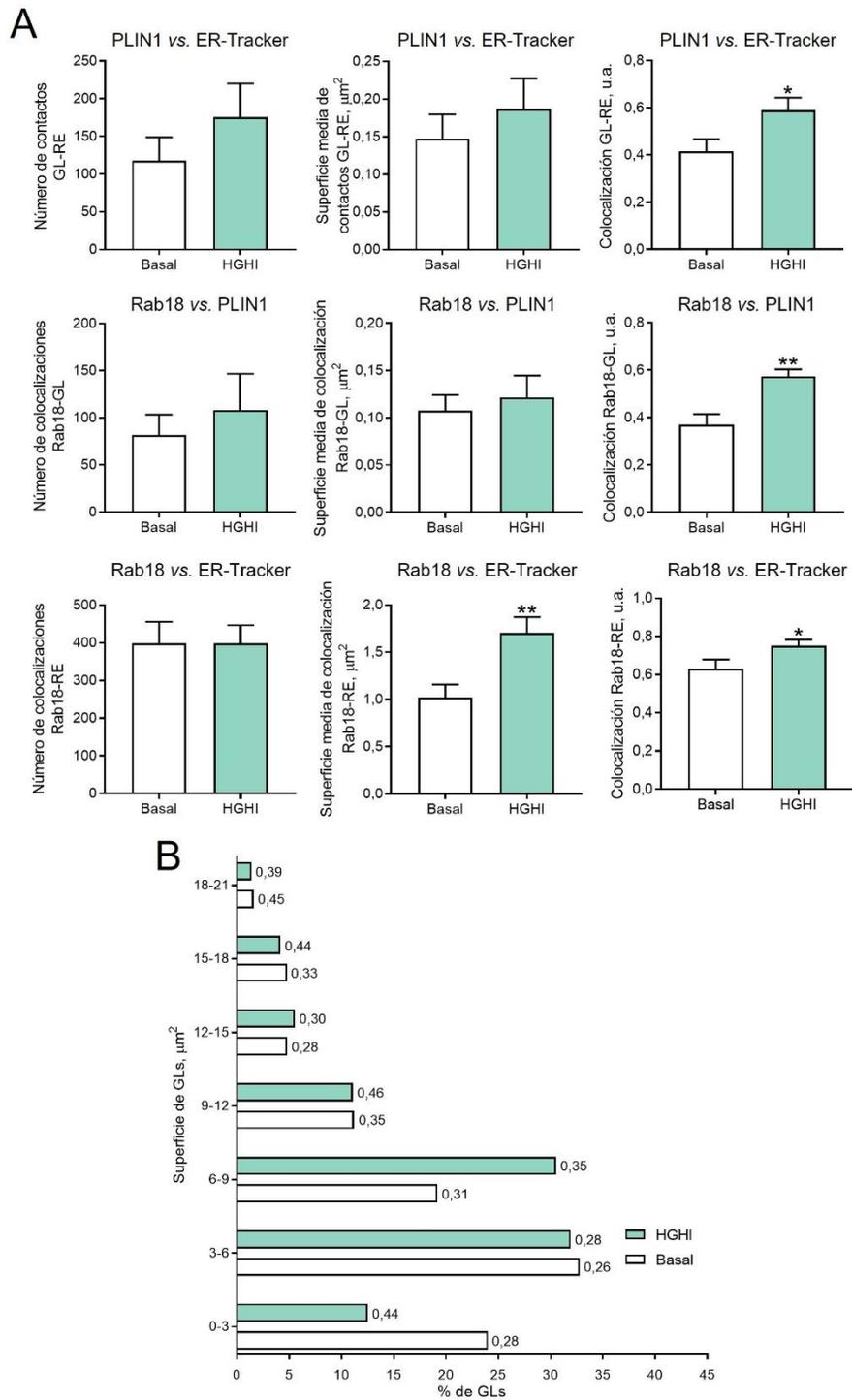


Figura 14. Estudio del contacto GL-RE y la colocalización de Rab18 con GLs y RE en HGHI en adipocitos. (A) Análisis morfométrico de la interacción entre Rab18, GLs y RE en células 3T3-L1 a D8 de diferenciación, en condiciones basales o de HGHI (24 h). Las gráficas muestran la media \pm SEM del número y área promedio (μm^2) de los contactos GLs-RE, así como el grado de colocalización entre tales estructuras y el de Rab18-GL/RE, medido con el coeficiente de Manders. **(B)** Distribución de frecuencias de GLs en base a intervalos de área de dichos orgánulos. A la derecha de cada barra se indica el coeficiente de Manders (u.a.) Rab18-GL para

cada grupo de datos. Se midieron 16 células por condición, de 2 experimentos independientes. *, P<0,05; **, P<0,01.

Se observó que principalmente hay una disminución en la cantidad de GLs más pequeñas (<3 μm^2), que tiende a compensarse aumentando la población de GLs medianas (6-9 μm^2). También destacó una tendencia de la colocalización Rab18-GL a incrementarse con el tratamiento de HGHI, independientemente del tamaño de las GLs (**Fig. 14B**). En este sentido la translocación de la GTPasa a la GL se ve beneficiada (**Fig. 14B**), aunque el RE, sigue reclutando más Rab18 que en las condiciones basales (**Fig. 14A**).

Por otro lado, en general, la ganancia o pérdida del número y tamaño de contactos entre parejas de orgánulos en patologías metabólicas ha sido relacionada, al menos en parte, con el establecimiento de contactos con otros orgánulos, fundamentalmente con los peroxisomas (Castro et al., 2018), especializados principalmente en la oxidación de ácidos grasos y en la síntesis de plasmalógenos, en cuanto al metabolismo lipídico se refiere (Castro et al., 2018).

Para estudiar la integridad de los peroxisomas y el efecto del tratamiento de HGHI sobre el contacto peroxisoma-RE, y el papel de Rab18 en la mediación del mismo, realizamos otras inmunocitoquímicas de triple tinción para marcar peroxisoma (anti-Catalasa, verde), RE (*ER-Tracker*, rojo), y Rab18 (anti-Rab18, magenta), en células 3T3-L1 diferenciadas hasta D8 (**Fig. 15**).

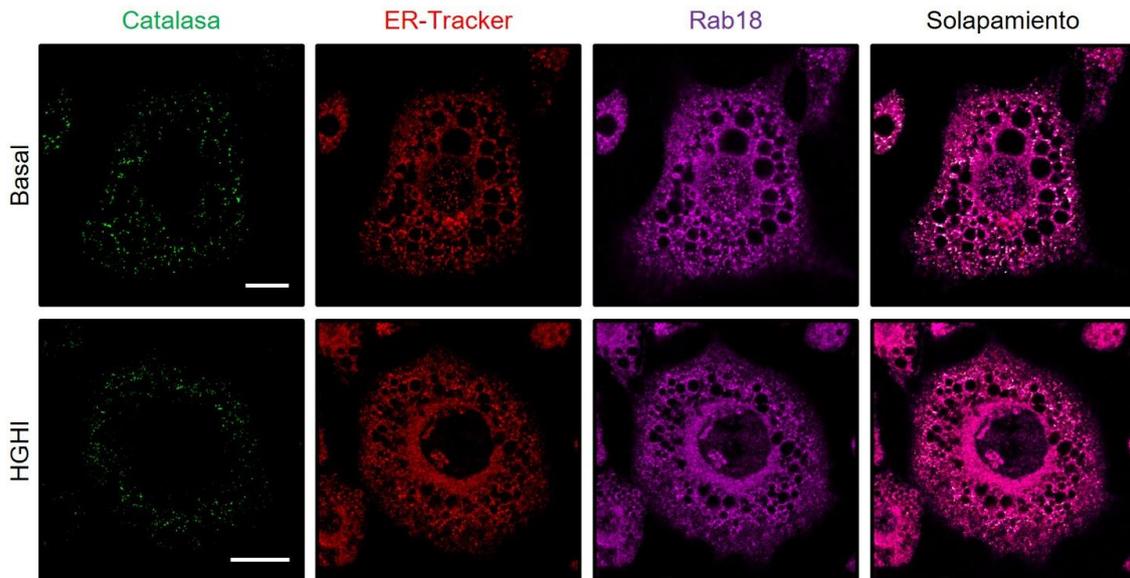


Figura 15. Asociación de Rab18 con peroxisomas y RE en condiciones de HGHI en adipocitos. Imágenes representativas de microscopía confocal de superresolución, de células 3T3-L1 a D8 de diferenciación, en condiciones basales o de HGHI (24 h). Las células fueron teñidas con anti-Catalasa (verde), *ER-Tracker* (rojo) y anti-Rab18 (magenta). Se capturaron micrografías de 10 células por condición, de 2 experimentos independientes. Barra de escala, 10 μm .

Se analizó la integridad de los peroxisomas en condiciones de HGHI en adipocitos 3T3-L1 diferenciados (**Fig. 16**). Los resultados mostraron que el contenido de peroxisomas no se vio alterado en estas condiciones. Estas observaciones sugieren que, en condiciones de IR, no se produce un cambio en la síntesis o gemación de vesículas pre-peroxisomales desde el RE (Hettema et al., 2014; van der Zand et al., 2006) ni de eventos de fusión/fisión de peroxisomas (Castro et al., 2018), ya que, en tal caso, el número de peroxisomas se afectaría significativamente (**Fig. 16**). Por otro lado, la superficie promedio ocupada por los peroxisomas marcados con anti-Catalasa no cambió significativamente (**Fig. 16**), indicando que los procesos dinámicos y de maduración en los que se ven implicados los peroxisomas (Smith and Aitchison, 2013) se encuentran en equilibrio.

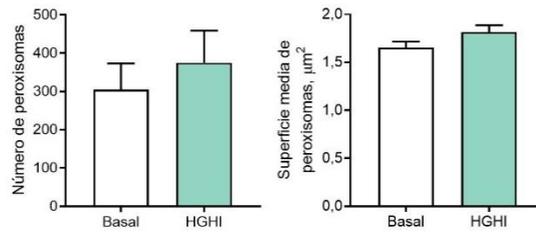


Figura 16. Integridad de los peroxisomas en condiciones de HGHI en adipocitos. Las gráficas muestran la media \pm SEM del número y área promedio (μm^2) de peroxisomas por célula. Se analizaron 10 células por condición, de 2 experimentos independientes.

A continuación, se analizó el número, área y grado de colocalización entre peroxisomas y RE, así como la asociación de Rab18 con los peroxisomas. Se observó un aumento en el número de contactos y del grado de colocalización entre el RE y los peroxisomas (**Fig. 17**).

En el caso de Rab18 no se observaron cambios significativos en la asociación Rab18-peroxisoma, ya que no hubo diferencias en el número, área y grado de colocalización en las células expuestas a HGHI (**Fig. 17**). No obstante, se pone de manifiesto por primera vez la posible unión de Rab18 a los peroxisomas en adipocitos, como muestran los numerosos objetos solapantes Rab18-peroxisomas detectados (**Fig. 15 y 17**), aunque en menor proporción y de menor tamaño que las estructuras Rab18-RE (**Fig. 14A**).

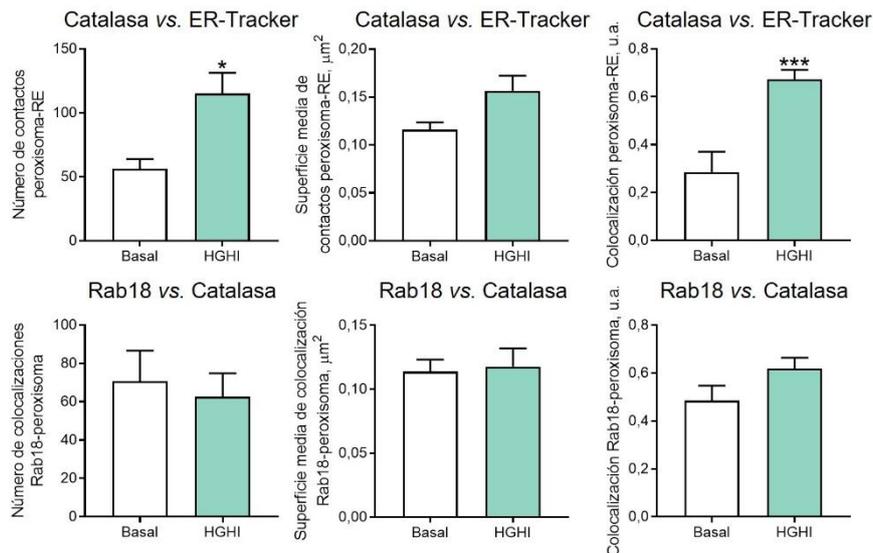


Figura 17. Estudio del contacto peroxisoma-RE y la colocalización de Rab18 con peroxisomas en condiciones de HGHI en adipocitos. Análisis morfométrico de la interacción entre peroxisomas, RE y Rab18 en células 3T3-L1 a D8 de diferenciación, en condiciones

basales o de HGHI (24 h). Las gráficas muestran la media \pm SEM del número y área promedio (μm^2) de los contactos peroxisoma-RE, así como el grado de colocalización entre tales estructuras y el de Rab18-peroxisoma, medido con el coeficiente de Manders. Se midieron 10 células por condición, de 2 experimentos independientes. *, $P < 0,05$; ***, $P < 0,001$.

Además, logramos identificar la presencia de Rab18 en el contacto RE-peroxisoma, como muestra la proporción de Rab18 asociado a RE y a su vez a peroxisomas (contacto Rab18-RE vs. peroxisomas), tanto en células basales como tratadas con HGHI (**Fig. 18**). Sin embargo, la diferencia entre el número de colocalizaciones Rab18-RE-peroxisomas no fue estadísticamente significativo, ni tampoco la superficie media ocupada por estos objetos (**Fig. 18**).

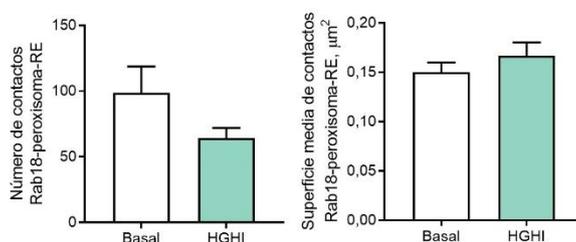


Figura 18. Estudio de los contactos Rab18-peroxisoma-RE en condiciones de HGHI en adipocitos. Análisis morfométrico del contacto entre los peroxisomas teñidos para Rab18 y catalasa (Rab18-peroxisoma) y el RE, en células 3T3-L1 a D8 de diferenciación en condiciones basales o de HGHI (24 h). Las gráficas muestran la media \pm SEM del número y área promedio (μm^2) de las colocalizaciones entre Rab18, peroxisoma (señal de catalasa) y RE (señal de *ER-Tracker*). Se midieron 10 células por condición, de 2 experimentos independientes.

Finalmente, se analizaron marcadores de tráfico de proteínas Rab (ARF1), estrés de RE (BIP, CHOP, p-PERK y PERK) y actividad peroxisomal (catalasa), así como la expresión de la propia Rab18 (**Fig. 19**). Se observó que la condición de IR disminuye la expresión de catalasa, mientras que los niveles de CHOP aumentaron (**Fig. 19**). El resto de las proteínas no mostró diferencias significativas. Estos resultados podrían sugerir que a pesar de que el número de peroxisomas no cambia, la funcionalidad de este orgánulo puede estar afectada. Por su parte, el incremento en los niveles de CHOP podría estar relacionado con la expansión de RE indicada anteriormente.

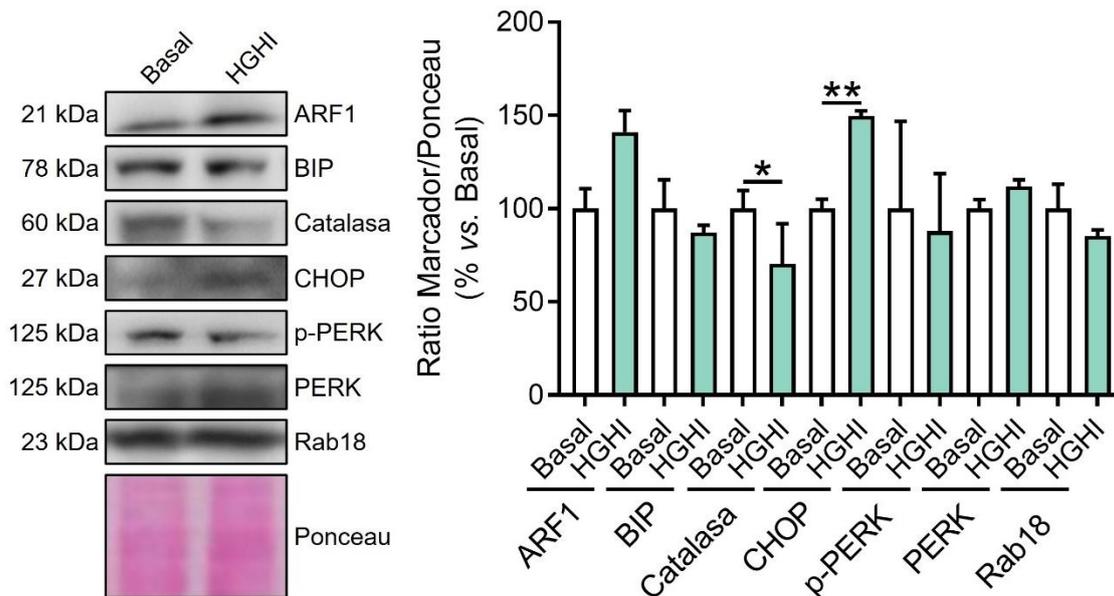


Figura 19. Contenido de marcadores de tráfico de proteínas Rab, estrés de RE, actividad peroxisomal y Rab18 en condiciones de HGHI en adipocitos. Se muestra el análisis de *immunoblotting* de la expresión de ARF1, BIP, catalasa, CHOP, p-PERK, PERK y Rab18 en adipocitos 3T3-L1 cultivados y diferenciados hasta D8, en presencia o ausencia de HGHI las últimas 24 h. Se analizaron 3 muestras por condición, de 3 experimentos independientes. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

4.4. La inflamación altera la asociación de orgánulos con el retículo endoplásmico

A continuación, los estudios de morfometría de GLs y RE, así como los de contactos y colocalización se hicieron con el modelo de inflamación inducida por TNF α . Los adipocitos se expusieron a TNF α durante 24 h para inducir la inflamación en los mismos. Inicialmente, se realizó una inmunocitoquímica con tinción triple para marcar GLs (PLIN, verde), RE (*ER-Tracker*, rojo) y Rab18 (anti-Rab18, magenta) (**Fig. 20**).

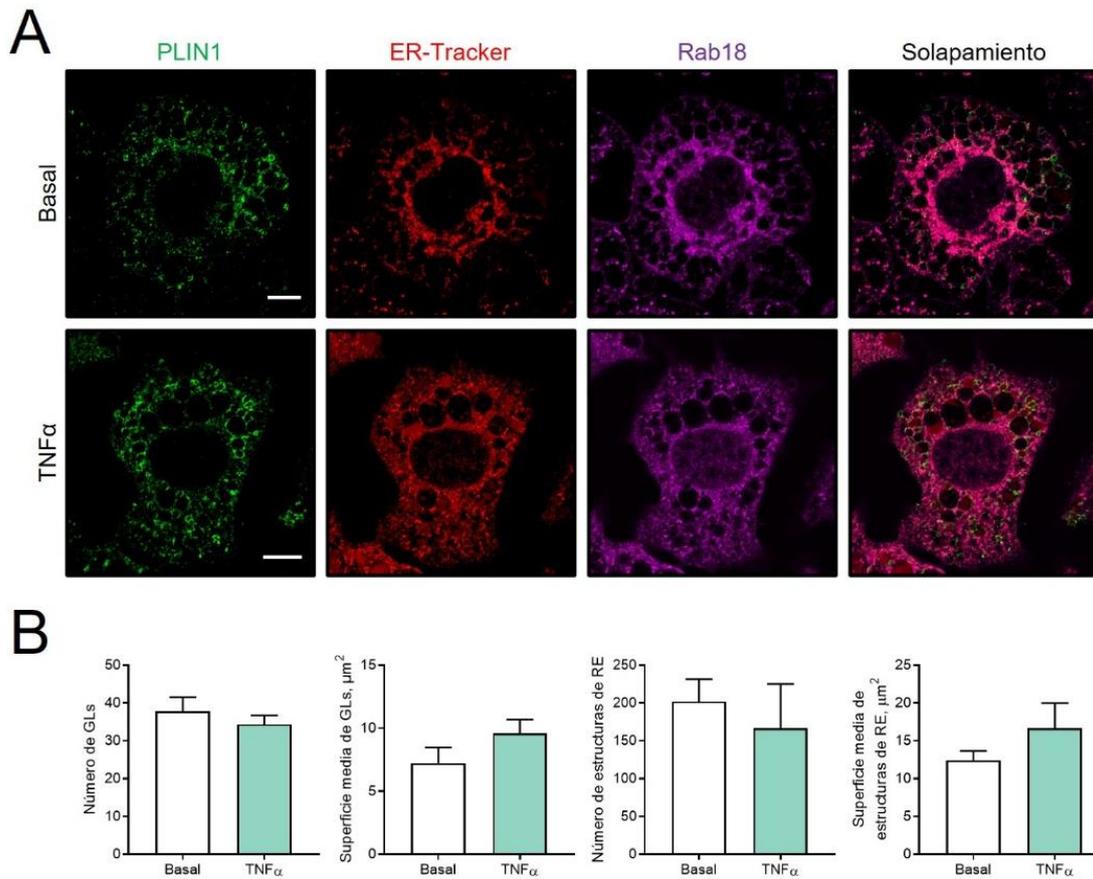


Figura 20. Interacción Rab18-GL-RE y morfometría de GLs y RE en condiciones de inflamación en adipocitos. Imágenes representativas de microscopía confocal de superresolución, de células 3T3-L1 a D8 de diferenciación, en condiciones basales o tratadas con TNF α (5 nM; 24 h). Las células fueron teñidas con anti-PLIN1 (verde), *ER-Tracker* (rojo) y anti-Rab18 (magenta). Se capturaron micrografías de 11 células por condición, de 2 experimentos independientes. Barra de escala, 10 μm .

Como se observa, las condiciones que mimetizan la situación de inflamación del adipocito obeso no cambiaron el número ni el tamaño promedio de las GLs, ni pusieron en marcha ningún mecanismo de estrés de RE observable a nivel celular (p.ej., expansión/fragmentación del RE, explicadas anteriormente), al no verse afectadas significativamente ni la cantidad ni la superficie de este orgánulo (**Fig. 20B**)

Seguidamente, se investigó la asociación entre los marcadores de GLs, RE y Rab18, y se encontró que el tratamiento con TNF α no provocó cambios en la colocalización Rab18-GL (**Fig. 21**). Por otro lado, el grado de colocalización GL-RE así como la superficie de colocalización Rab18-RE se incrementaron en condiciones de inflamación de forma acusada y significativa en las células

tratadas con TNF α (**Fig. 21**). Un cambio similar a lo que ocurría en el modelo de HGHI (**Fig. 14A**), con excepción de que en inflamación una proporción de Rab18 proveniente desde otros orgánulos es más retenida en la membrana del RE que en la de la GL (que no cambia su colocalización Rab18-PLIN1), y no a ambos orgánulos por igual como ocurrió en el modelo de IR (**Fig. 14A**).

Como en los modelos anteriores, para investigar en mayor profundidad si el tráfico de Rab18 a las GLs de adipocitos 3T3-L1 se ve afectado por esta condición dependiendo del tamaño de estos orgánulos se realizó una distribución de frecuencias de GLs por intervalos de área, y se enfrentaron a los coeficientes de colocalización Rab18-GL (**Fig. 21B**).

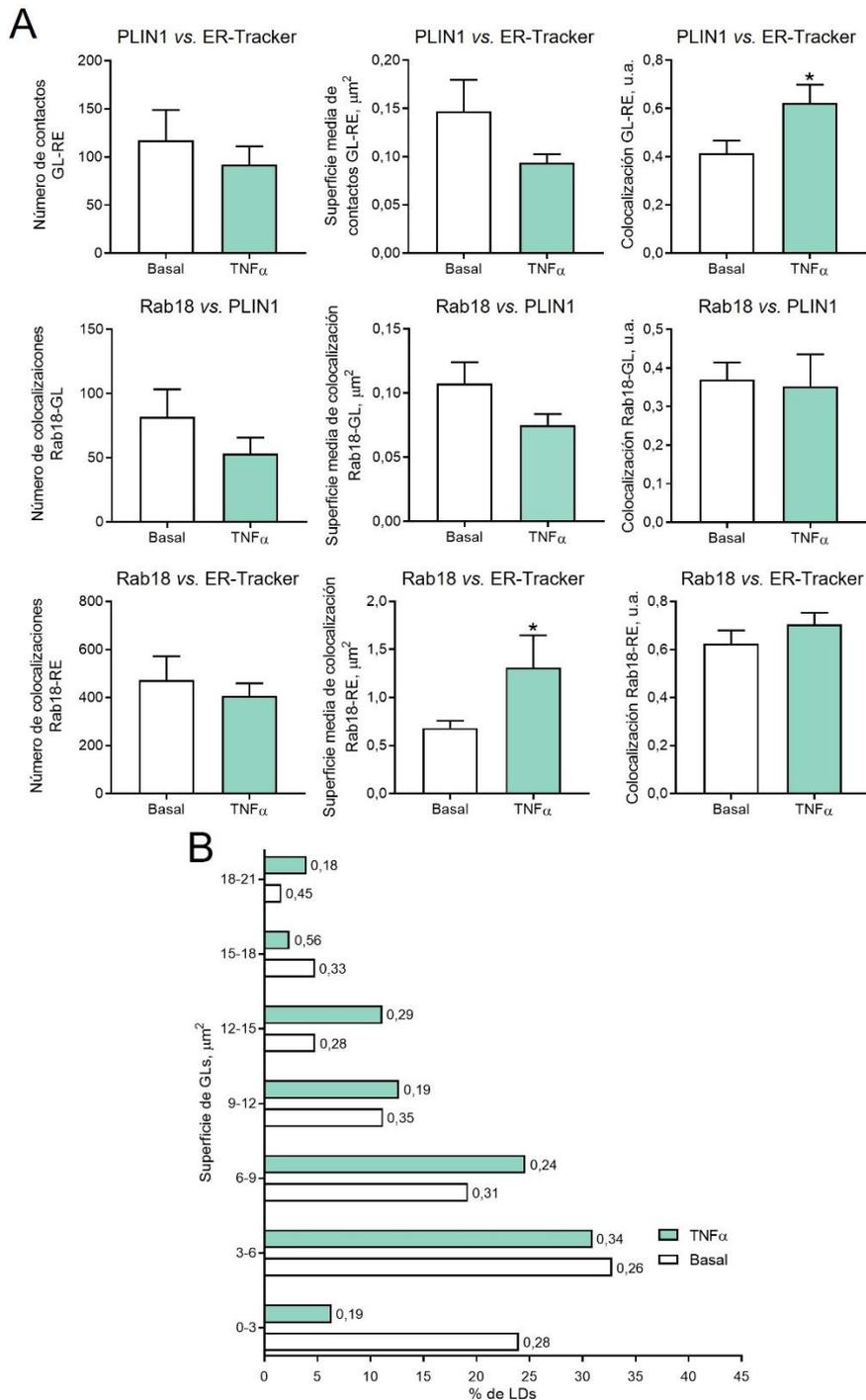


Figura 21. Estudio del contacto GL-RE y la colocalización de Rab18 con GLs y RE en condiciones de inflamación en adipocitos. (A) Análisis morfométrico de la interacción entre Rab18, GLs y RE en células 3T3-L1 a D8 de diferenciación, en condiciones basales o tratadas con TNF α (5 nM; 24 h). Las gráficas muestran la media \pm SEM del número y área promedio (μm^2) de los contactos GLs-RE, así como el grado de colocalización entre tales estructuras y el de Rab18-GL/RE, medido con el coeficiente de Manders. **(B)** Distribución de frecuencias de GLs en base a intervalos de área de dichos orgánulos. A la derecha de cada barra se indica el coeficiente de Manders (u.a.) Rab18-GL para cada grupo de datos. Se midieron 11 células por condición, de 2 experimentos independientes. *, P<0,05.

Se observó que principalmente hay un descenso en la cantidad de GLs más pequeñas ($<3 \mu\text{m}^2$), en favor de la población de GLs medianas ($6-9 \mu\text{m}^2$), y grandes ($12-15 \mu\text{m}^2$ y $18-21 \mu\text{m}^2$) y una tendencia de la colocalización Rab18-PLIN1 a compensarse en todos los grupos de tamaños (GLs pequeñas: $<6 \mu\text{m}^2$; medianas: $6-12 \mu\text{m}^2$; y grandes: $>12 \mu\text{m}^2$) (**Fig. 21B**). En este sentido la translocación de la GTPasa a la GL no se ve alterada (**Fig. 21B**), aunque el RE, sigue reclutando más Rab18 que en las condiciones basales, como ocurría en los otros dos modelos patológicos de obesidad (**Figs. 9, 14A, 21A**).

De forma análoga a lo expuesto en el apartado anterior, también se realizó el estudio de colocalización entre peroxisomas (marcados con anti-Catalasa, verde), RE (marcado con *ER-Tracker*, rojo) y Rab18 (marcado con anti-Rab18, magenta) en condiciones basales y de inflamación inducida con $\text{TNF}\alpha$ (**Fig. 22**).

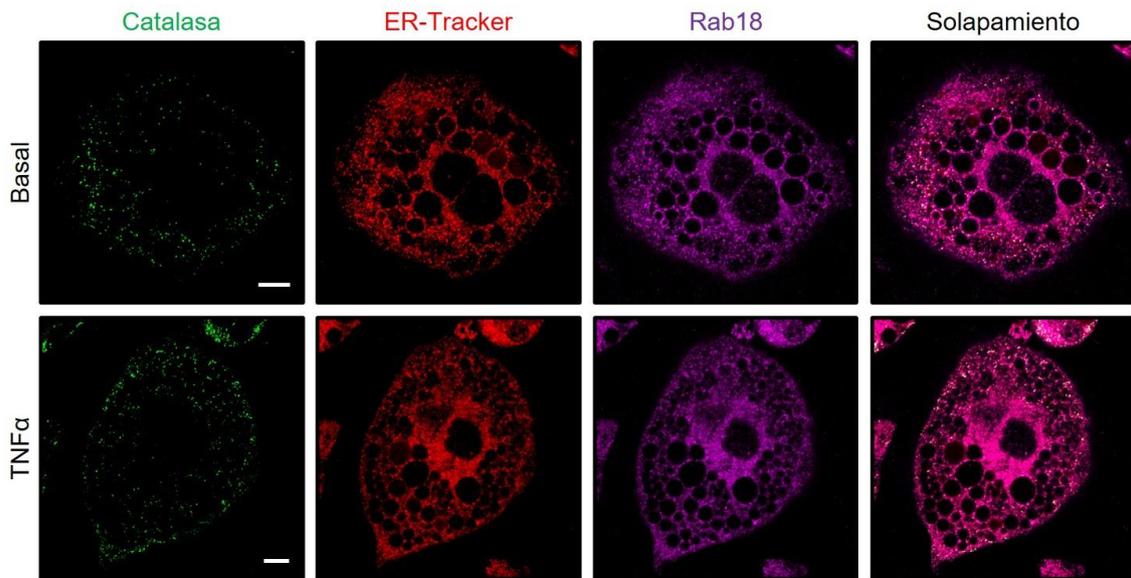


Figura 22. Asociación de Rab18 con peroxisomas y RE en condiciones de inflamación en adipocitos. Imágenes representativas de microscopía confocal de superresolución, de células 3T3-L1 a D8 de diferenciación, en condiciones basales o tratadas con $\text{TNF}\alpha$ (5 nM; 24 h). Las células fueron teñidas con anti-Catalasa (verde), *ER-Tracker* (rojo) y anti-Rab18 (magenta). Se capturaron micrografías de 12 células por condición, de 2 experimentos independientes. Barra de escala, 10 μm .

La cuantificación de peroxisomas no mostró cambios significativos en el número y área de los peroxisomas en adipocitos en condiciones de inflamación respecto a los adipocitos en condiciones basales (**Fig. 23**).

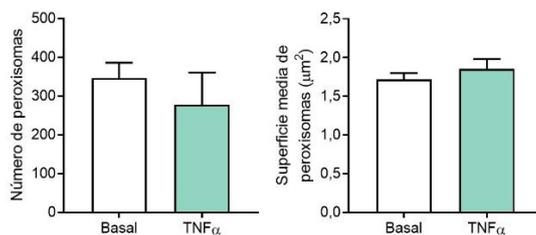


Figura 23. Integridad de los peroxisomas en condiciones de inflamación en adipocitos. Las gráficas muestran la media \pm SEM del número y área promedio (μm^2) de peroxisomas por célula. Se analizaron 12 células por condición, de 2 experimentos independientes.

El análisis de solapamiento de señales confirmó de nuevo la presencia de Rab18 en peroxisomas en adipocitos 3T3-L1, y puso de manifiesto un aumento de la colocalización RE-peroxisoma y una disminución del número de colocalizaciones Rab18-peroxisoma en las células que simulan las condiciones de inflamación respecto a las células basales (**Fig. 24**).

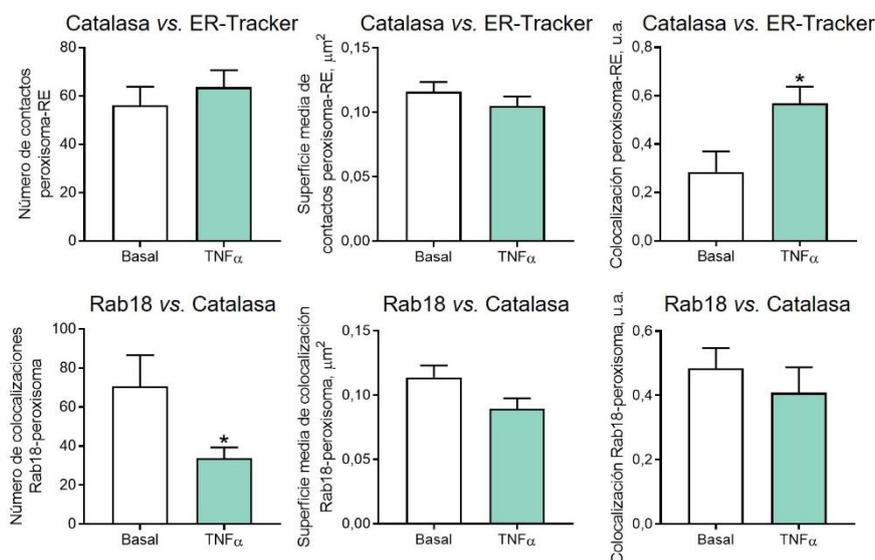


Figura 24. Estudio del contacto peroxisoma-RE y la colocalización de Rab18 con peroxisomas en condiciones de inflamación en adipocitos. Análisis morfométrico de la colocalización entre Rab18, peroxisomas y RE en células 3T3-L1 a D8 de diferenciación, en condiciones basales o tratadas con TNF α (5 nM; 24 h). Las gráficas muestran la media \pm SEM del número y área promedio (μm^2) de los contactos peroxisoma-RE, así como el grado de

colocalización entre tales estructuras y el de Rab18-peroxisoma, medido con el coeficiente de Manders. Se midieron 12 células por condición, de 2 experimentos independientes. *, $P < 0,05$.

La observación de un aumento de los contactos RE-peroxisoma (como ocurre en las células con IR) junto a una disminución del número de colocalizaciones Rab18-peroxisoma (**Fig. 23**) y a la ausencia de variaciones significativas en el número y superficie de estructuras del RE y los peroxisomas (**Figs. 20B, 23**), podría explicarse por su acumulación en el RE o por la disminución del tránsito de Rab18 desde el RE a otros orgánulos, o al aumento del tráfico desde otros orgánulos (p. ej. peroxisomas) hacia el RE. Así, un aumento del contenido de Rab18 en el RE y la ausencia concomitante de Rab18 en otras membranas diana podría promover el contacto RE-peroxisoma. De hecho, el transporte de Rab18 a sus orgánulos diana está mediado en gran parte por dominios específicos del RE, presumiblemente ERES, (Jayson et al., 2018; Li et al., 2019), por lo que un bloqueo en la ruta de transporte de Rab18 podría afectar al contenido de Rab18 de otros orgánulos y en consecuencia a su dinámica de formación de contactos interorgánulos. Por otra parte, que el modelo de inflamación mediado por TNF α , aumente el grado de colocalización RE-peroxisoma podría explicarse como un efecto compensatorio que ponga en marcha la producción de defensas antioxidantes, ya que la unión RE-peroxisoma es crucial para la síntesis de plasmalógenos, usados como defensa antioxidante, especialmente en inflamación (Hadj Ahmed et al., 2017).

En resumen, nuestros resultados proponen un papel para Rab18 en peroxisomas, no descrito hasta ahora en adipocitos, además de formar parte de los contactos RE-peroxisomas, tanto en adipocitos sanos como patológicos, ya sea en IR (**Fig. 18**) o en inflamación (**Fig. 25**). No obstante, la presencia de Rab18 en la asociación de RE-peroxisoma tampoco se vio afectada en inflamación, ni en cuanto al número de contactos ni a la superficie de los mismos (**Fig. 25**), al igual que ocurrió en el modelo de IR.

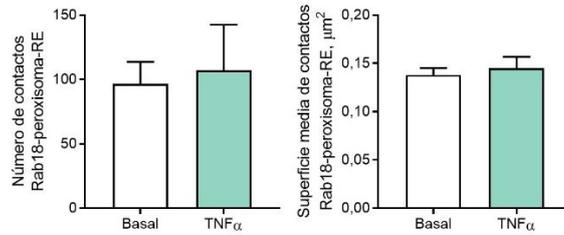


Figura 25. Estudio de los contactos Rab18-peroxisoma-RE en condiciones de inflamación en adipocitos. Análisis morfométrico del contacto entre los peroxisomas teñidos para Rab18 y catalasa (Rab18-peroxisoma) y el RE, en células 3T3-L1 a D8 de diferenciación en condiciones basales o tratados con TNF α (5 nM; 24 h). Las gráficas muestran la media \pm SEM del número y área promedio (μm^2) de las colocalizaciones entre Rab18, peroxisoma (señal de catalasa) y RE (señal de *ER-Tracker*). Se midieron 12 células por condición, de 2 experimentos independientes.

El análisis de expresión de Rab18, marcadores del tráfico de proteínas Rab (ARF1), estrés de RE (BIP, CHOP, p-PERK y PERK) y actividad peroxisomal (catalasa) (**Fig. 26**) demostró que no se producen cambios significativos en sus niveles en adipocitos tratados con TNF α (24 h), de modo que el aumento en la asociación GL-RE, peroxisoma-RE, Rab18-RE y la disminución de la asociación de Rab18-peroxisoma, podrían estar mediados, al menos en parte, por otros parámetros metabólicos que no se han tenido en cuenta en este estudio. Otro factor a valorar sería incrementar la dosis de TNF α o el tiempo de exposición al fármaco (**Fig. 26**).

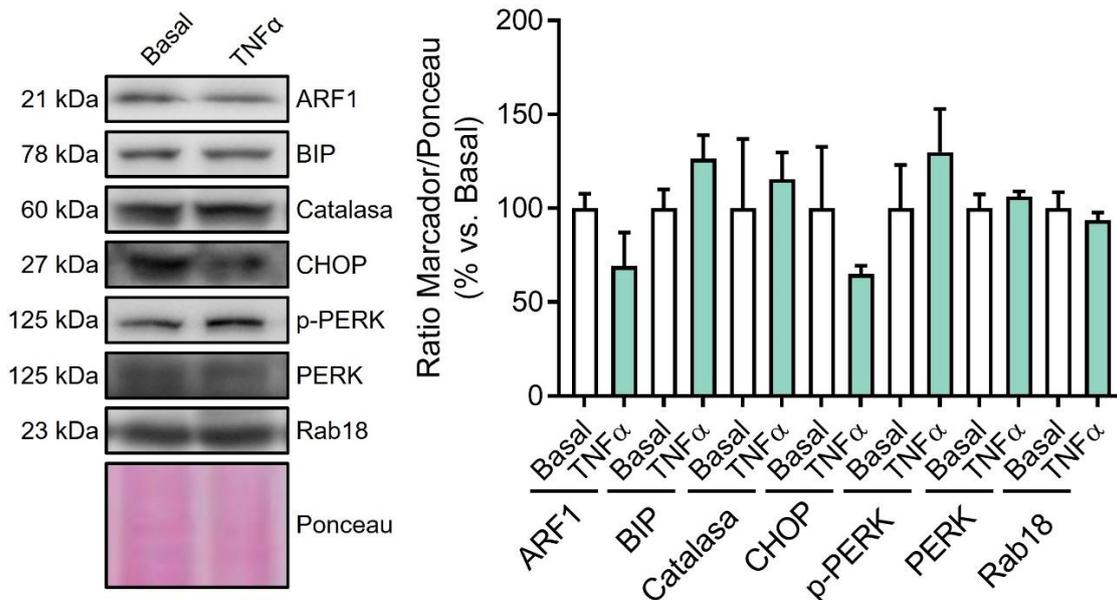


Figura 26. Contenido de marcadores de tráfico de proteínas Rab, estrés de RE, actividad peroxisomal y Rab18, en condiciones de inflamación en adipocitos. Se muestra el análisis de *immunoblot* de la expresión de ARF1, BIP, catalasa, CHOP, p-PERK, PERK y Rab18 en adipocitos 3T3-L1 cultivados y diferenciados hasta D8, en presencia o ausencia de TNF α (5 nM) las últimas 24 h. Se analizaron 3 muestras por condición, de 3 experimentos independientes.

4.5. Rab18 protege del contacto peroxisoma-retículo endoplásmico

Para estudiar el papel específico de Rab18 en la dinámica de estos orgánulos, se realizó un modelo de silenciamiento de la proteína y se analizó nuevamente el grado de colocación de peroxisoma-RE en adipocitos 3T3-L1 a D8 de diferenciación, teñidos para peroxisomas (anti-catalasa) y RE (*ER-Tracker*) (**Fig. 27A**). De esta forma, si Rab18 juega un papel en el contacto entre los peroxisomas y el RE, como se ha visto en los modelos estudiados en los apartados anteriores, el contacto entre estos dos orgánulos debería verse afectado. Para ello, en primer lugar, se validó la eficacia del silenciamiento mediante la medida de expresión de la proteína Rab18 en dichos adipocitos. Como se observa en la **Figura 27B**, las células silenciadas mostraron una disminución en la expresión de Rab18 de aproximadamente un 35%.

Posteriormente, en el análisis de la asociación peroxisoma-RE se observó un aumento no significativo del número de contactos entre ambos orgánulos en células silenciadas (**Fig. 27C**). Por su parte, al medir la superficie promedio de estos contactos, no se apreciaron cambios entre ambas condiciones (**Fig. 27C**). No obstante, se produjo un aumento del grado de colocación entre los peroxisomas y el RE en las células silenciadas (**Fig. 27C**).

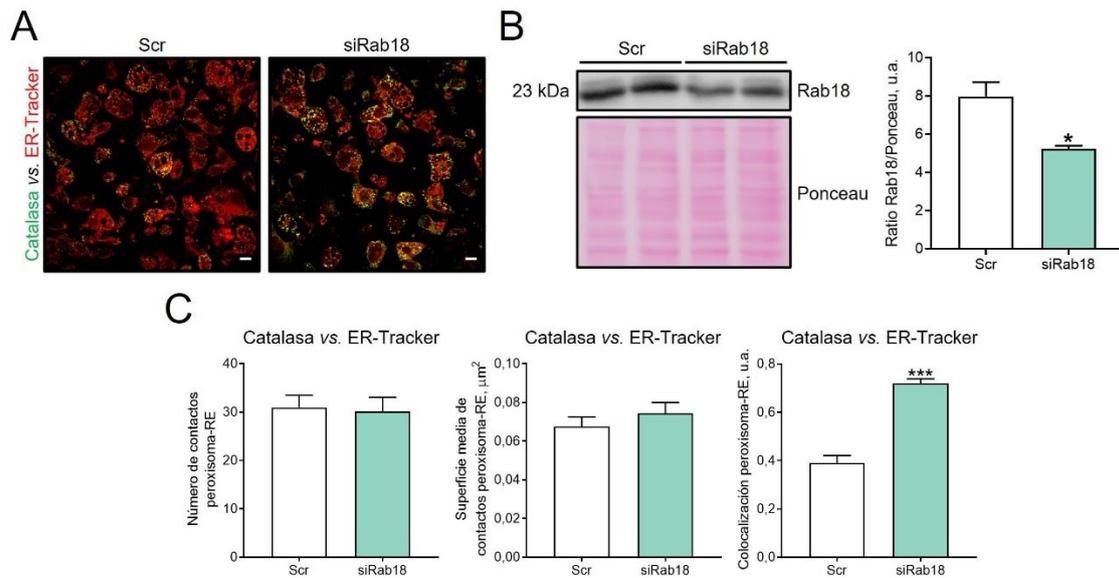


Figura 27. Efecto del silenciamiento de Rab18 sobre el contacto peroxisoma-RE en adipocitos. (A) Análisis morfométrico del contacto peroxisoma-RE en células 3T3-L1 silenciadas para Rab18 (siRab18) o control (Scr) a D8 de diferenciación. (B) Validación del silenciamiento de Rab18 por *immunoblot*, en 3 experimentos independientes de cada condición. Las gráficas muestran la media \pm SEM de: (B) la intensidad de la banda de Rab18 respecto a su control de carga (Ponceau); y (C) del número y área promedio (μm^2) de los contactos peroxisoma-RE, así como de la colocalización entre ambos orgánulos. El grado de colocalización entre tales estructuras fue medido con el coeficiente de Manders (u.a.). Se analizaron 38 células de 7 campos por condición, de 2 experimentos independientes. *, $P < 0,05$; ***, $P < 0,001$.

Este último resultado puede ser explicado a nivel microscópico por una disminución del tamaño del RE (presumiblemente consecuencia de una fragmentación de RE, como ocurrió en el modelo de fibrosis) tras el silenciamiento de Rab18, ya que este parámetro se calcula dividiendo la cantidad de píxeles de peroxisomas y RE que colocalizan (señal amarilla) entre la señal de mayor número de píxeles (en este caso la del RE, señal roja). Nuestra hipótesis fue confirmada al analizar la integridad del RE y de los peroxisomas (Fig. 28). De hecho, no se observaron cambios en el número y tamaño de los peroxisomas entre las células *scramble* (Scr) y las silenciadas (siRab18) (Fig. 28).

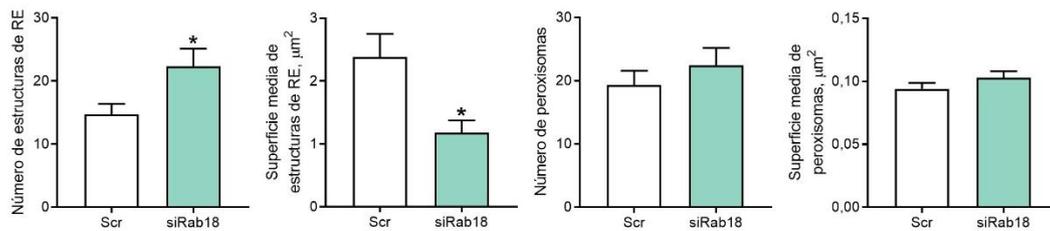


Figura 28. Integridad de los peroxisomas y el RE en silenciamiento de Rab18 en adipocitos.

Las gráficas muestran la media \pm SEM del número y área promedio (μm^2) de peroxisomas o estructuras de RE por célula. Se analizaron 38 células de 7 campos por condición, de 2 experimentos independientes. *, $P < 0,05$.

Posteriormente realizamos un análisis más profundo para determinar qué tipo de peroxisomas son atraídos hacia el RE en ausencia de Rab18. Para ello se realizó una distribución de frecuencias del tamaño de peroxisomas en función del porcentaje de peroxisomas y su colocación con RE. Se observó que el silenciamiento de Rab18 aumentó la colocación de los peroxisomas de mayor tamaño con RE, aunque la cantidad de éstos no se diferenció de la condición Scr (**Fig. 29**). De hecho, en otro diagrama tridimensional se representó la distancia mínima entre la membrana de cada peroxisoma y la estructura de RE más próxima, y se demostró que los peroxisomas más grandes estaban más cerca (menor distancia) de los objetos de RE (**Fig. 30**).

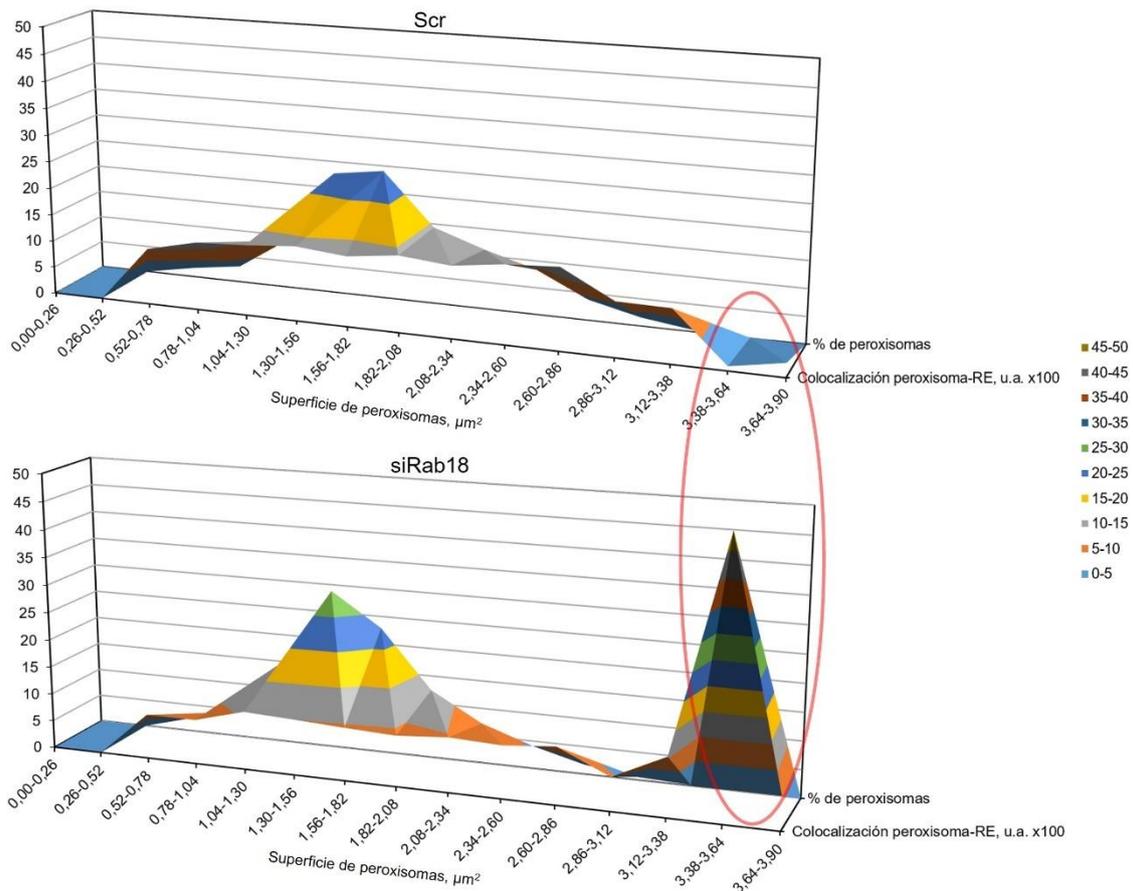


Figura 29. Estudio del contacto peroxisoma-RE, en relación al tamaño y cantidad de peroxisomas en adipocitos silenciados para Rab18. Representación tridimensional de la distribución de frecuencias de peroxisomas (% de peroxisomas) frente al grado de colocalización peroxisoma-RE (expresado como el coeficiente de Manders, u.a. x100,) y a la superficie de peroxisomas (expresada en intervalos de tamaño). Se analizaron 38 células de 7 campos por condición, de 2 experimentos independientes.

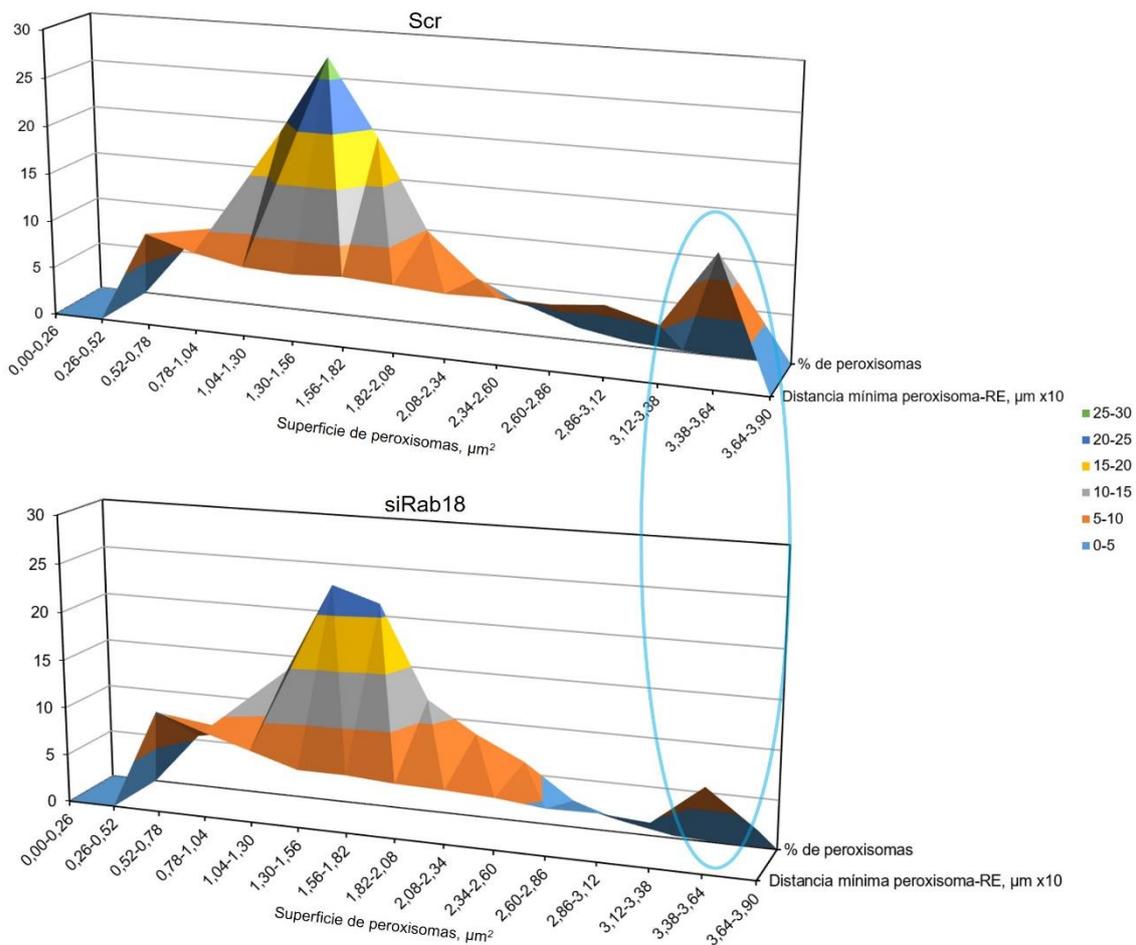


Figura 30. Estudio de la distancia peroxisoma-RE, en relación al tamaño y cantidad de peroxisomas en adipocitos silenciados para Rab18. Representación tridimensional de la distribución de frecuencias de peroxisomas (% de peroxisomas) frente a la distancia mínima peroxisoma-RE (expresada en $\mu\text{m} \times 10$) y a la superficie de peroxisomas (expresada en intervalos de tamaño). Se analizaron 38 células de 7 campos por condición, de 2 experimentos independientes.

En resumen, estos resultados sugieren que la ausencia de Rab18 en otros orgánulos (posiblemente GL) o sitios de contacto diferentes a RE-peroxisoma promueve el contacto de estos dos orgánulos.

4.6. Rab18 alcanza la gota lipídica a través del ER en adipocitos humanos

Llegados a este punto, nuestros resultados sugieren que los sitios de contacto RE-GL son importantes para la translocación de proteínas a la GL, incluso de la propia GTPasa Rab18, que también media dicho contacto y, presumiblemente,

difunde por los puentes establecidos entre subdominios del RE y la GL para acceder a la superficie de la GL, donde realiza su función moduladora de la dinámica del metabolismo lipídico (Jayson et al., 2018; Li et al., 2019). Puesto que los resultados anteriores han mostrado que tanto cambios de expresión de *Rab18* y como algunos de los tratamientos alteran la distribución de *Rab18* y la organización intracelular, nos propusimos investigar cómo se produce el tráfico de *Rab18* desde el RE hasta la GL en células humanas. Para ello, se realizaron inmunocitoquímicas de adipocitos humanos de pacientes NG, tanto de tejido TAO como de TAS, diferenciados *in vitro* hasta etapas tempranas (D5) y tardías (D10) de diferenciación, con marcadores de ER (*ER-Tracker*), ERGIC (anti-ERGIC53) y ERES (anti-SEC16A) y se examinó su colocalización con *Rab18*. Para evitar reacciones cruzadas entre anticuerpos de la misma especie, el solapamiento entre *Rab18* y SEC16A se estudió usando el vector de expresión *GFP-Rab18* para detectar la señal de *Rab18* (**Fig. 31A**).

Los resultados muestran que *Rab18* se localiza en RE y ERGIC en tejido adiposo humano, independientemente del estado de diferenciación. Esto se puede observar principalmente en etapas tempranas de diferenciación, en las que *Rab18* colocaliza fuertemente con RE y ERGIC pero no colocaliza con el marcador de ERES, ni en TAO ni en TAS (**Fig. 31B**).

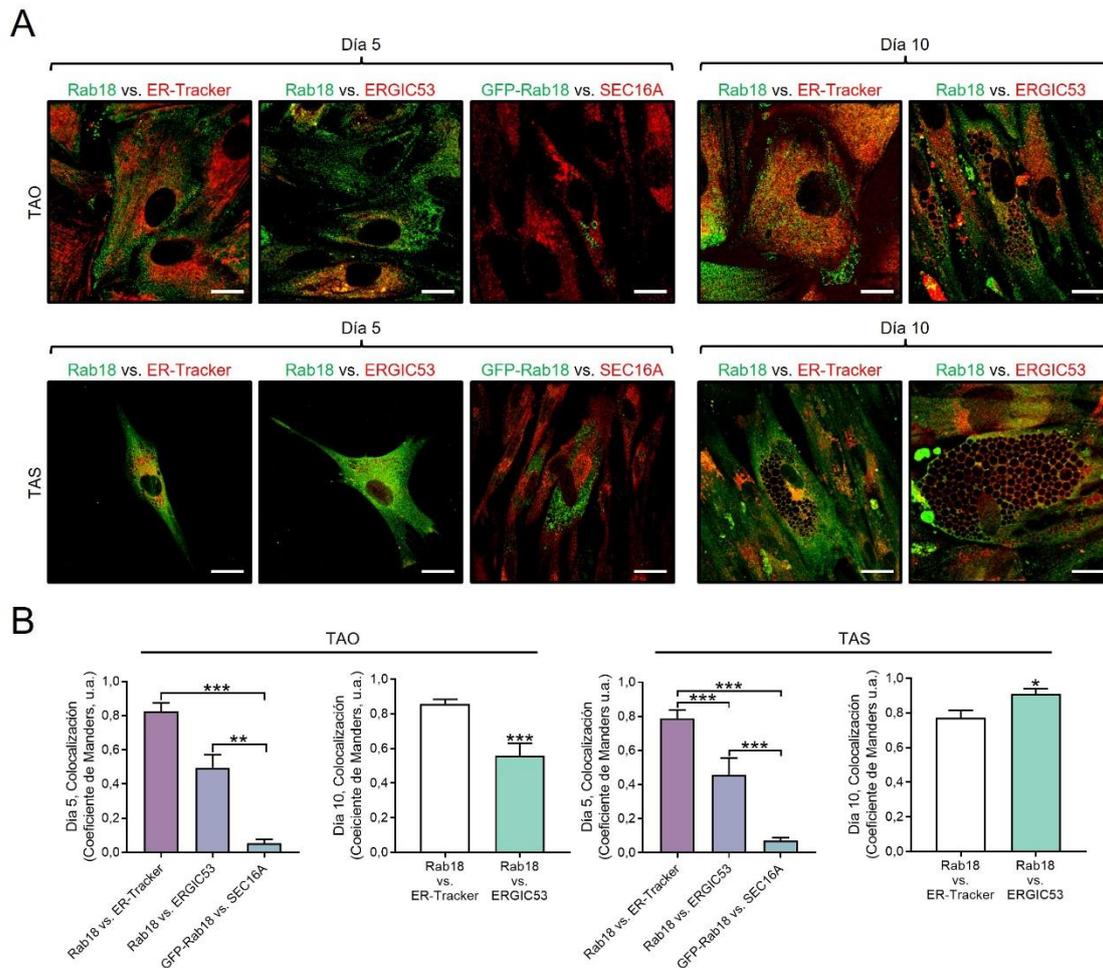


Figura 31. Estudio de las posibles rutas de Rab18 para acceder a la GL. (A) Imágenes representativas de microscopía confocal de adipocitos humanos procedentes de los depósitos TAO y TAS de pacientes NG, a D5 y D10 de diferenciación. Las células fueron teñidas en rojo con *ER-Tracker*, anti-ERGIC53, anti-SEC16A y observadas en verde con anti-Rab18 y GFP-Rab18. **(B)** El grado de colocalización entre tales estructuras fue medido con el coeficiente de Manders. Se midieron 13 células por condición. Barra de escala, 10 μm . *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$.

4.7. Rab18 presenta dimorfismo sexual en tejido adiposo de pacientes obesos

A continuación, se midieron mediante *immunoblot* los niveles de expresión de Rab18 en muestras de TAO y TAS, procedentes de pacientes NG, IR y DT2. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto el dimorfismo sexual de Rab18 en condiciones de NG, dado que el contenido de Rab18 en TAO mostró ser más bajo en hombres obesos NG que en mujeres obesas NG, las cuales, además,

exhibieron menor cantidad de Rab18 en condiciones de IR que las mujeres obesas NG y con diabetes mellitus tipo 2 (DT2) (**Fig. 32**).

Se ha visto que la distribución de la adiposidad en los depósitos y la prevalencia de la resistencia a insulina es diferente entre sexos (Geer and Shen, 2009). De modo que los hombres tienen una mayor adiposidad visceral que las mujeres, en las cuales predomina el TAS mientras que en hombres predomina el TAO (Geer and Shen, 2009). Esta diferencia otorga a las mujeres una protección mayor frente a la IR (Geer and Shen, 2009), lo cual se podría relacionar con el mayor contenido de Rab18 en TAS (**Fig. 32**) que en TAO (**Fig. 32**) de mujeres, indicando que Rab18 podría tener un papel protector frente al desarrollo de resistencia a insulina (Geer and Shen, 2009).

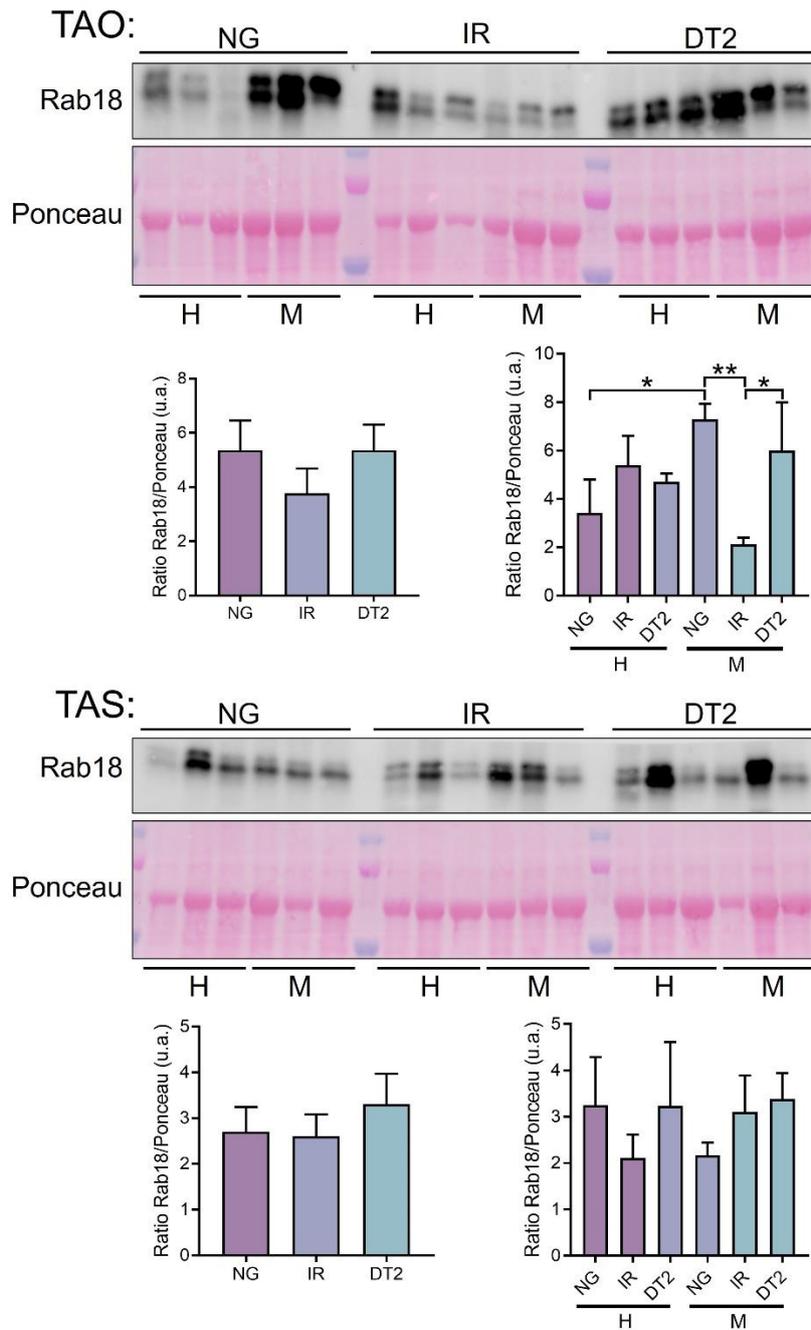


Figura 32. Immunoblotting de muestras de TAO y TAS de pacientes obesos NG, IR y DT2.

Se analizaron las muestras de tejido adiposo de los dos compartimentos de 3 hombres y 3 mujeres de cada condición. La proteína se detectó con anti-Rab18 y su contenido se evaluó utilizando la tinción de rojo Ponceau como control de carga. H, Hombre; M, mujer; *, P<0.05; **, P<0,01.

SEGUNDO ESTUDIO: *Caracterización funcional de Rab34 en adipocitos y regulación de esta GTPasa en respuesta a procesos patológicos asociados a obesidad*

4.8. Rab34 como un modelo de tráfico de proteínas a las gotas lipídicas durante la diferenciación adipocitaria

Recientemente identificamos a Rab34 como un componente del proteoma de la GL en adipocitos diferenciados 3T3-L1 (Guzmán-Ruiz et al., 2020). Con objeto de estudiar en detalle su papel durante la diferenciación, analizamos la expresión de Rab34 en este tipo celular, así como su distribución por microscopía confocal. Brevemente, se observó un aumento progresivo del contenido de la Rab GTPasa a lo largo del proceso de diferenciación (D0-D10), a la vez que cambiaba su localización desde las caras *cis* y *trans* del aparato de Golgi (en etapas tempranas de la diferenciación, D0-D3) a la superficie de las GLs (en etapas tardías de la diferenciación, D3 en adelante) (ver sección 1.6.2. *Rab34/Fig. 2A, B*). El estudio del tráfico de Rab34 durante la adipogénesis permitió descubrir que Rab34 migra a las GLs nacientes pasando por el ERGIC tan pronto como éstas se forman (ver sección 1.6.2. *Rab34/Fig. 2C*) en el citoplasma de preadipocitos en diferenciación (Ntambi and Young-Cheul, 2000), a partir del D3. Sin embargo, la vía de transporte (anterógrado/retrógrado) seguida por esta GTPasa continuaba siendo un interrogante hasta el desarrollo de este trabajo, especialmente para acceder a las GLs maduras, para las que se ha propuesto que los ERES actúan como plataforma de translocación de proteínas desde el RE (Song et al., 2022).

En este sentido, tomando ventaja de la localización dual de Rab34 dependiente de la etapa de diferenciación del adipocito nos propusimos explorar si esta GTPasa podría alcanzar la superficie de las GLs expandidas usando la ruta dependiente de ERES, de manera alternativa a la vía ERGIC. Para ello, llevamos a cabo un estudio de marcaje doble en células 3T3-L1 a lo largo de su diferenciación (D0-D10) usando el marcador de localización de ERES, SEC16A, en combinación con el vector plasmídico de expresión GFP-Rab34, ya que no se disponía de antisueros apropiados contra Rab34 o SEC16A que permitieran realizar este experimento de doble inmunomarcaje.

Los resultados mostraron un incremento gradual del coeficiente de Manders de SEC16A con GFP-Rab34 desde D0 a D10 (**Fig. 33**).

En contraste con la colocalización entre las inmunoseñales de ERGIC y Rab34, que alcanzó un pico a D3 (y luego disminuyó), la de ERES y GFP-Rab34 alcanzó su máximo a D10, con un coeficiente de Manders significativamente superior al de D3, lo que postula a ERES como una ruta de translocación de la proteína Rab34 a la GL, alternativa a la de ERGIC, probablemente implicada en la reposición de Rab34 a las GLs de mayor tamaño.

Cabe mencionar que la distribución de GFP-Rab34 se mostró comparable con la de Rab34 endógena tanto a etapas tempranas como tardías de diferenciación, con parte del marcaje persistiendo en el Golgi de células diferenciadas (**Fig. 33**).

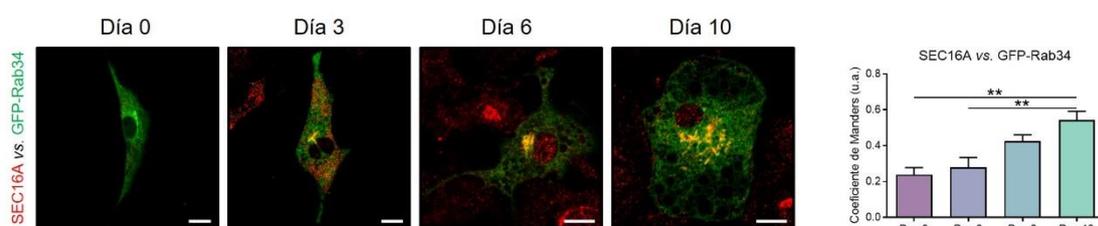


Figura 33. Distribución de GFP-Rab34 y su colocalización con ERES durante la diferenciación de células 3T3-L1 a adipocitos. Imágenes representativas de microscopía confocal de células 3T3-L1 en diferenciación (días 0, 3, 6 y 10) transfectadas con GFP-Rab34 (verde) e inmunoteñidas para el marcador de ERES, SEC16A (rojo). A la derecha, se muestra el estudio de colocalización de Rab34 con SEC16A durante el proceso de diferenciación de las células 3T3-L1. Los coeficientes de Manders fueron calculados para evaluar la colocalización entre señales. Los datos son expresados como la media \pm SEM (n=12 células por día de diferenciación, 2 estudios replicados). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. Barra de escala, 10 μ m.

Adicionalmente, la distribución intracelular de la variante constitutivamente activa de Rab34, GFP-Rab34-Q111L (unida a GTP), fue similar a la de la versión WT (**Fig. 34A**). Por el contrario, una señal de intensidad ligeramente inferior fue observada por la variante constitutivamente inactiva, GFP-Rab34-T66N (unida a GDP), la cual fue restringida al aparato de Golgi (**Fig. 34B**), consistente con los reportes previos sobre la expresión de esta variante en otros tipos celulares (Shu et al., 2015). En resumen, estos resultados demuestran que Rab34 exhibe un

patrón distinto de localización intracelular dependiente de su grado de activación, a lo largo del proceso de diferenciación adipocitaria, y que su unión a GTP es necesaria para alcanzar la cubierta de la GL.

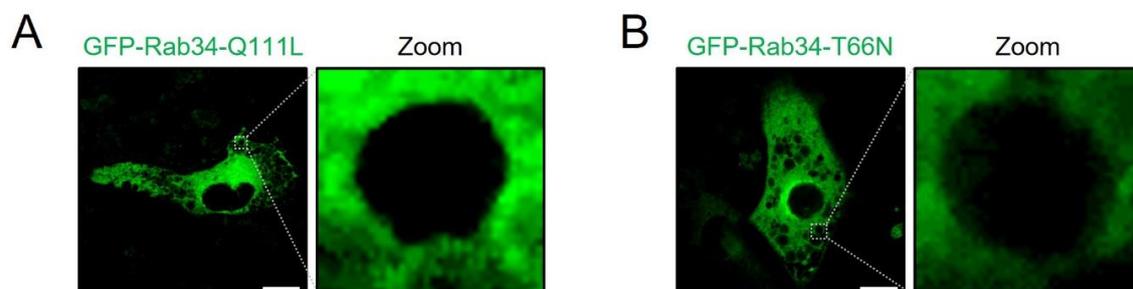


Figura 34. Localización de las variantes de actividad de Rab34 expresadas endógenamente en adipocitos 3T3-L1. **(A, B)** Imágenes representativas de microscopía confocal de células 3T3-L1 transfectadas con vectores de expresión codificantes para la proteína mutante de Rab34 constitutivamente activa (GFP-Rab34-Q111L; **A**) o inactiva (GFP-Rab34-T66N; **B**). Los zooms muestran ampliaciones de imágenes de GLs.

No obstante, destaca que el suministro de proteínas a las GLs ocurre en el contexto de una estrecha aposición tanto del ERGIC como de los ERES con las GLs, y que para algunas proteínas está mediado por el coatómero *Coat protein complex I* (COPI) (Soni et al., 2009). De hecho, la colocalización de Rab34 con el marcador de COPI, ARF1, es considerablemente alta en D3 y D10 (ver sección 1.6.2. *Rab34/Fig. 2C*).

Finalmente, ya que la maquinaria de tráfico vesicular ARF1/COPI es requerida para la ruta de RE a GL que siguen muchas proteínas asociadas a GL (Wilfling et al., 2014b), exploramos si este sistema fue también importante para el tráfico de Rab34 a GLs en adipocitos. Para este fin, las células 3T3-L1 fueron expuestas a BFA, un inhibidor reversible del tráfico de cargos desde RE a GL (Hsu and Yang, 2009), a etapas tempranas (D2) y tardías (D4) de diferenciación. Como se esperó, el tratamiento de BFA indujo fragmentación de Golgi (**Fig. 35A**). Aunque el tratamiento de BFA redujo el tamaño de las GLs, particularmente en las células tratadas a D2, no se observaron cambios en el número de GLs (**Fig. 35A**). Los estudios de expresión de proteína indicaron que el contenido de Rab34 no fue alterado por BFA a ninguno de los periodos de diferenciación testados (**Fig. 35B**). Sin embargo, nuestros estudios de microscopía revelaron que la

administración de BFA a células 3T3-L1, ya sea a D2 o D4, disminuyó la asociación de Rab34 con GLs, independientemente del tamaño de las GLs (**Fig. 35C**). En particular, el efecto inhibitorio de BFA sobre la unión de Rab34 a GLs fue considerablemente mayor cuando el fármaco fue administrado a etapas tempranas de la diferenciación (reducción del 50% en células tratadas a D2 frente al 23% a D4, respecto a sus respectivos controles) (**Fig. 35C**).

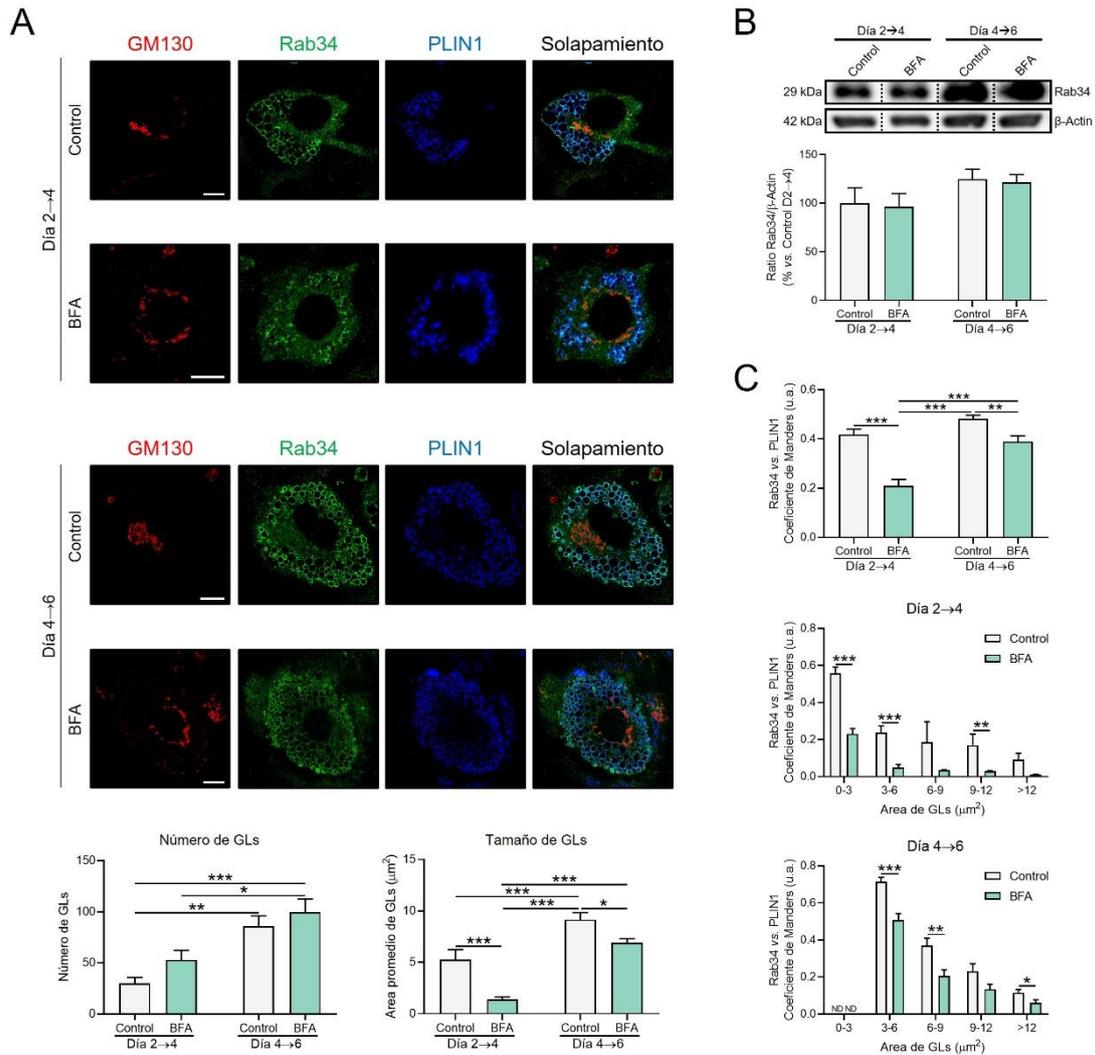


Figura 35. Análisis de la asociación de Rab34 con GLs tras el tratamiento de BFA. Las células 3T3-L1 fueron expuestas a BFA (20 μmol/L, 1 h) a día 2 o 4 de diferenciación. 48 h después del tratamiento, las células fueron procesadas para microscopía confocal o estudios de *immunoblotting*. **(A)** Las células fueron triplemente inmunoteñidas con anti-GM130, anti-Rab34 y anti-PLIN1. Las gráficas muestran el número y área promedio de GLs (μm²) por célula y por condición experimental (n=10 células/condición experimental, 2 estudios replicados). Barra de escala, 10 μm. **(B)** Análisis de *immunoblotting* del contenido de Rab34 en células expuestas a medio solo (control) o con BFA a día 2 o 4. Los datos son referidos a los cultivos control a día 2 de diferenciación (100%) y expresados como media ± SEM (n=3 experimentos

individuales/condición experimental). (C) Coeficiente de Manders (expresado en unidades arbitrarias, a.u.) para evaluar la colocalización de las inmunoseñales de Rab34 y PLIN1 en células 3T3-L1, expresado como el valor promedio por célula (gráfica superior) o de acuerdo al área de GL (μm^2) (gráficas del medio e inferiores). Los datos son expresados como la media \pm SEM (n=10 células/condición experimental, 2 estudios replicados). *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001.

Estos datos apoyan colectivamente que tras la síntesis de Rab34, la proteína se acumula en el aparato de Golgi de preadipocitos. Más tarde, cuando se induce la biogénesis de GL, la GTPasa migra a ERGIC o ERES, probablemente a través de la ruta de transporte dependiente de ARF1 y vesículas COPI. Durante la formación de GL, Rab34 alcanza la superficie de estos orgánulos a través del RE, principalmente por la vía ERGIC, mientras que la vía ERES podría representar la ruta principal de acceso de Rab34 desde el RE a las GLs maduras o en expansión.

4.9. Papel de Rab34 en la organización del aparato de Golgi

Basándonos en la localización de Rab34 en preadipocitos, investigamos si esta podría estar implicada en la organización del aparato de Golgi y el tráfico de membranas. Para este fin, los efectos de la expresión de GFP-Rab34 (48 h después de la transfección a D3) sobre la estructura del aparato de Golgi fueron analizados previamente en el laboratorio (ver sección 1.6.2. *Rab34/Fig. 3A*), y en este trabajo se analizaron por primera vez los de la reducción transitoria por silenciamiento dependiente de siRNA (72 h después del silenciamiento). Si bien la expresión de GFP-Rab34 causaba un incremento significativo en el número de fragmentos del aparato de Golgi sin afectar su área total (ver sección 1.6.2. *Rab34/Fig. 3A*), el silenciamiento de Rab34 no tuvo efecto sobre estos dos parámetros (**Fig. 36**).

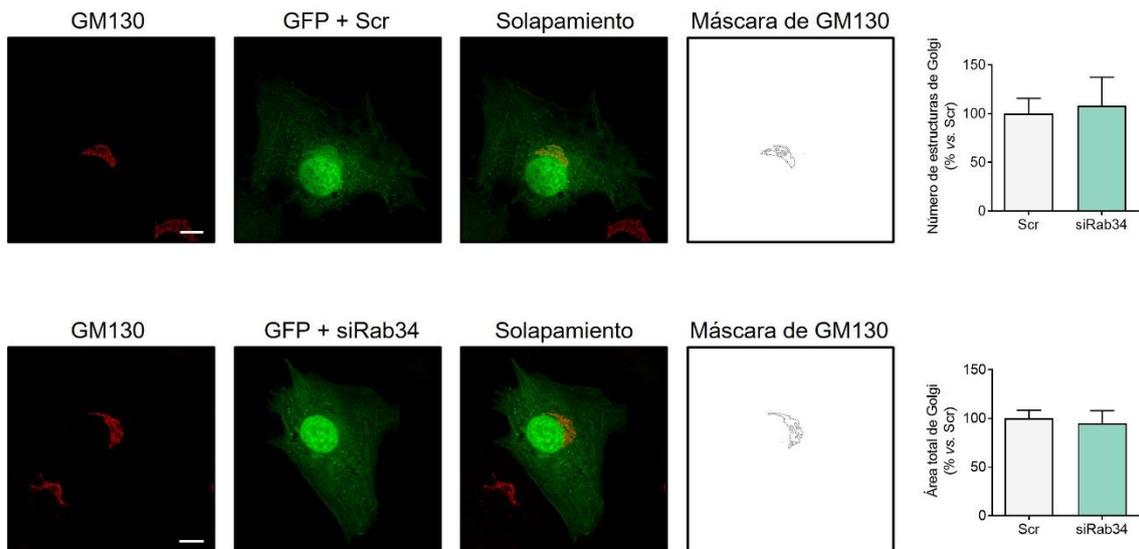


Figura 36. Efectos del silenciamiento de Rab34 sobre la organización estructural del aparato de Golgi en adipocitos. Imágenes representativas de células 3T3-L1 transfectadas con *Scramble* siRNA (Scr) o Rab34 siRNA (siRab34), y teñidas con anti-GM130. El análisis morfométrico fue llevado a cabo usando el *software* ImageJ. El número de estructuras GM130-positivas y el área total de Golgi en las células silenciadas con siRab34 es referido a sus correspondientes controles (Scr; 100%). Los datos son expresados como la media \pm SEM (n=10 células/condición experimental, 2 estudios replicados). Barra de escala, 10 μ m.

Adicionalmente, estudiamos los efectos de estos cambios de expresión de Rab34 sobre la estructura del RE. Se observó que la disminución de Rab34 indujo fragmentación de RE (**Fig. 37B**), mientras que su expresión no cambió ni el número de estructuras de RE ni el área total de RE (**Figs. 37A**). Estos resultados sugirieron que la ganancia de función de Rab34 es más importante para la organización del Golgi que su pérdida, y lo contrario se deduce para el RE. En conjunto, estos resultados indicaron que Rab34 podría actuar como una proteína Rab de Clase 2 asociada a Golgi y relacionada con las rutas de transporte de Golgi a RE, como se sugirió para otras proteínas Rab con efectos similares en el Golgi tras su activación o inactivación (Liu and Storrie, 2015).

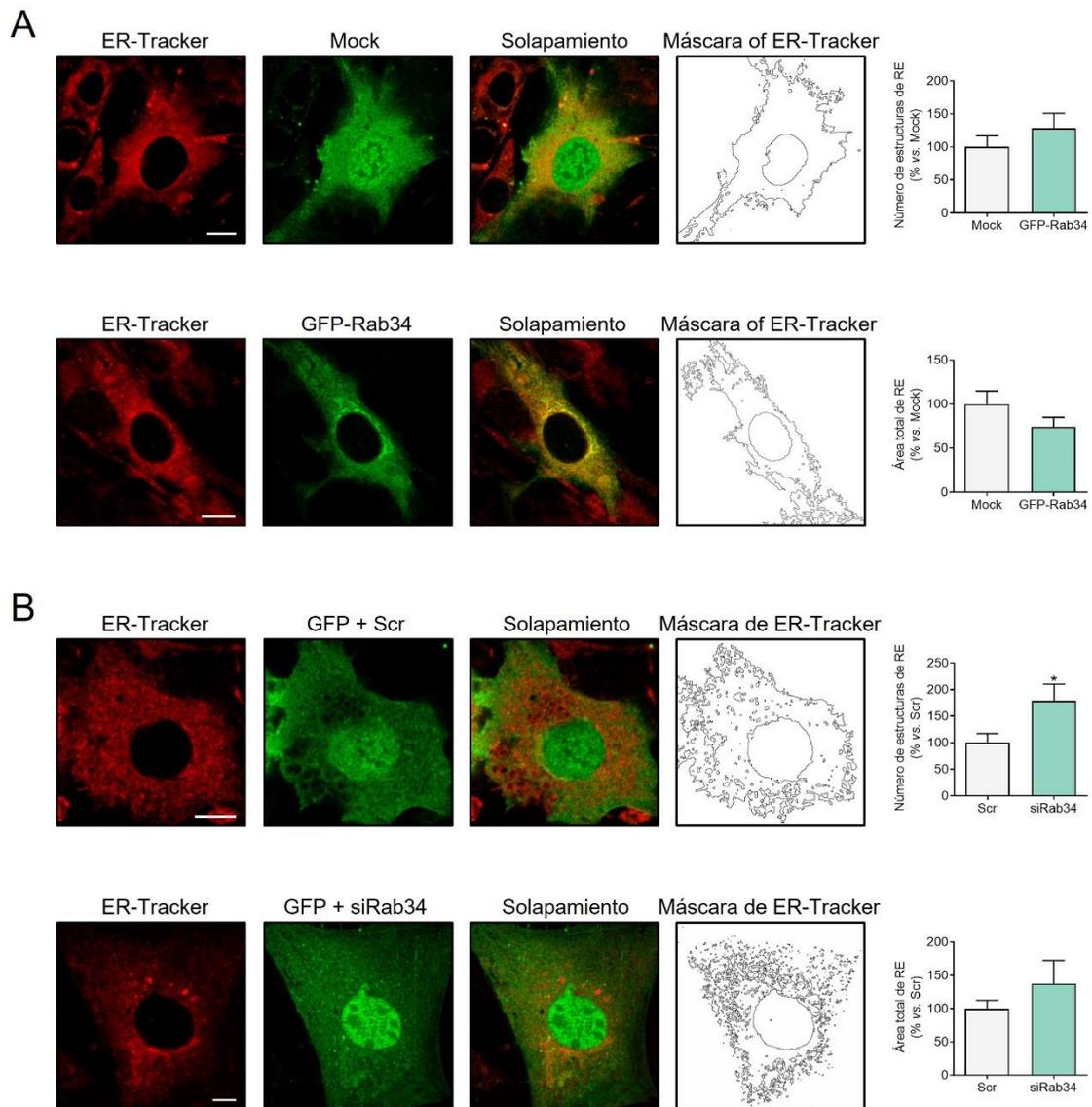


Figura 37. Efectos del silenciamiento/expresión de Rab34 sobre la organización estructural del RE en adipocitos. Imágenes representativas de células 3T3-L1 transfectadas con los vectores GFP (*Mock*) o GFP-Rab34, y *Scramble* siRNA (Scr) o Rab34 siRNA (siRab34), y teñidas con *ER-Tracker*. Los análisis morfométricos fueron llevados a cabo usando el *software* ImageJ. El número de estructuras *ER-Tracker*-positivas y el área total de RE en las células que expresan o silencian Rab34 fue referido a sus correspondientes controles (*Mock/Scr*; 100%). Los datos son expresados como la media \pm SEM ($n=10$ células/condición experimental, 2 estudios replicados). Barra de escala, 10 μ m.

4.10. Papel de Rab34 en la función del adipocito

La presencia de Rab34 desde etapas tempranas de diferenciación del adipocito (en el Golgi) hasta la completa diferenciación del adipocito maduro (en las GLs)

sugirió la participación de esta GTPasa en la regulación de las funciones del adipocito: i) como una célula endocrina, y/o ii) como eje central para el almacenamiento y liberación de energía (Malagon et al., 2014).

4.10.1. Rab34 regula la secreción y oligomerización de adiponectina

Para determinar el impacto de Rab34 en la función del adipocito, analizamos primero si cambios en sus niveles podrían afectar la actividad secretora de los adipocitos evaluando la producción de adiponectina, una adipocina principal con propiedades de sensibilización de insulina y antiinflamatorias (Wang and Scherer, 2016). La cuantificación de niveles de adiponectina extra- e intracelulares en adipocitos 3T3-L1 por ELISA mostró que mientras la expresión de GFP-Rab34 incrementó la síntesis y secreción de adiponectina (**Fig. 38A**), el tratamiento de siRab34 disminuyó ambos parámetros (**Fig. 38B**). Además, los estudios de expresión de proteína bajo condiciones no desnaturalizantes revelaron que la expresión de GFP-Rab34 incrementó la producción de multímeros de adiponectina, probablemente a expensas de los hexámeros, mientras que el silenciamiento de Rab34 disminuyó el contenido de trímeros (**Figs. 38C, D**).

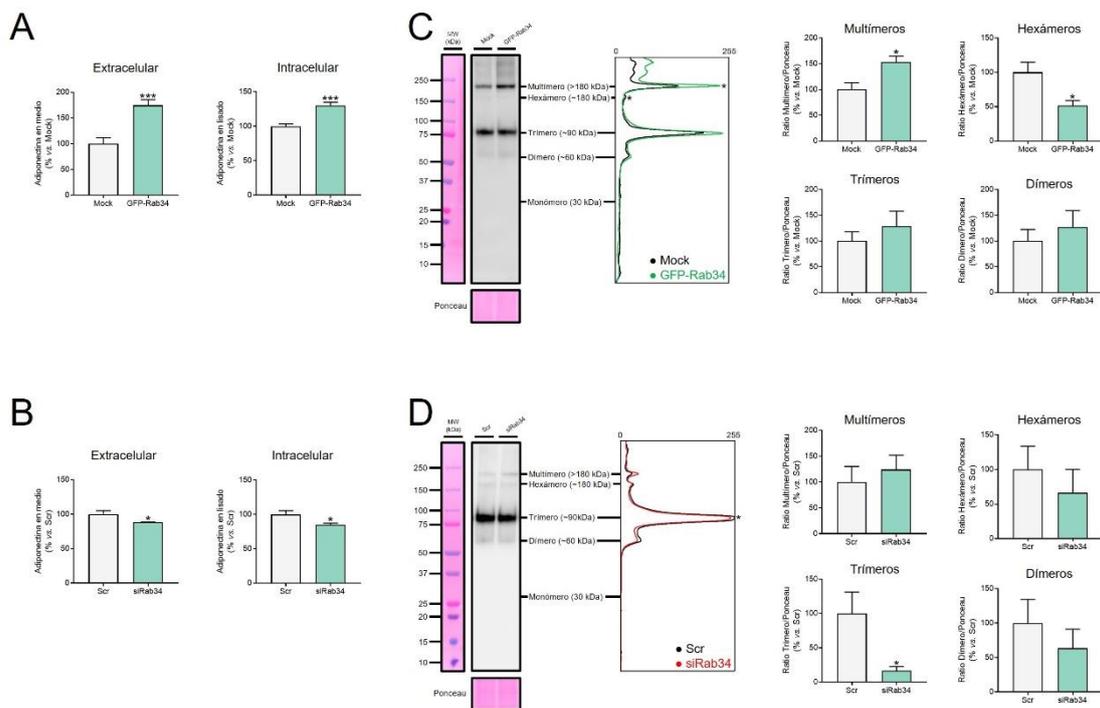


Figura 38. Efectos de la expresión/silenciamiento de Rab34 sobre la ruta secretora en adipocitos 3T3-L1. (A, B) Cuantificación de la secreción de adiponectina y (C, D) su oligomerización en células control (Mock/Scr) o transfectadas con GFP-Rab34 (A, C) o siRab34 (B, D). (A, B) El contenido de adiponectina en el medio de cultivo (extracelular) y extracto de proteína (intracelular) en células control o transfectadas con GFP-Rab34 (A) o siRab34 (B) fue analizado por ELISA (n=6 experimentos individuales). (C, D) *Immunoblots* representativos y cuantificación de multímeros de adiponectina, hexámeros, trímeros y dímeros en extractos celulares de células control y transfectadas con GFP-Rab34 (C) o transfectadas con siRab34 (D). Las muestras celulares fueron recogidas y las proteínas fueron resueltas en geles SDS-PAGE no reductores con un gradiente 4-20% y transferidas a una membrana de *immunoblot*. Las bandas de expresión fueron analizadas densitométricamente. La tinción reversible de Ponceau S fue usada como control de carga. Los datos fueron referidos a los de las células control (Mock; Scr) (100%) y expresados como la media \pm SEM (n=6 experimentos individuales). *, P<0.05; ***P<0.001 vs. Mock/Scr.

4.10.2. Rab34 es un componente regulador de la cubierta de las gotas lipídicas en adipocitos

Basándonos en nuestros resultados que muestran la asociación de Rab34 con GLs desde D3 en adelante (ver sección 1.6.2. *Rab34/Fig. 2A, B*), y que el aumento de los niveles de Rab34 incrementa el 78.9% el tamaño de GLs a etapas tardías de diferenciación (ver sección 1.6.2. *Rab34/Fig. 3B*), decidimos explorar si la expresión o silenciamiento de Rab34 (**Fig. 39A**) modifica el contenido intracelular de TAGs (en el extracto celular) y de glicerol libre (en el medio de cultivo). Los análisis indicaron que tras la expresión de Rab34 el contenido intracelular de lípidos fue aumentado en un 54,1% y que la lipólisis basal fue disminuida en un 20,5% (**Fig. 39B**). Por otro lado, destacaba que el silenciamiento de Rab34 por siRNA no tuviera efectos sobre la cantidad de GLs, aunque su tamaño medio tendía a descender (ver sección 1.6.2. *Rab34/Fig. 3C*), y que la tasa lipogénica se redujera significativamente (**Fig. 39C**). Un análisis más profundo de la distribución por tamaño de GLs, mostró que el tratamiento con siRab34 incrementó el número de GLs medianas (6-9 μm^2) mientras que disminuyó el de las pequeñas (<3 μm^2) (**Fig. 39D**), lo que podría explicar la reducción del contenido de TAGs en estas condiciones (**Fig. 39C**). Notablemente, los experimentos de rescate (silenciamiento y expresión de Rab34 conjuntamente) devolvieron los niveles proteicos de Rab34 a valores

basales (**Fig. 39E**) y claramente se revirtieron los efectos inducidos por esta GTPasa sobre el contenido de TAGs (**Fig. 39F**) y la lipólisis (**Fig. 39G**).

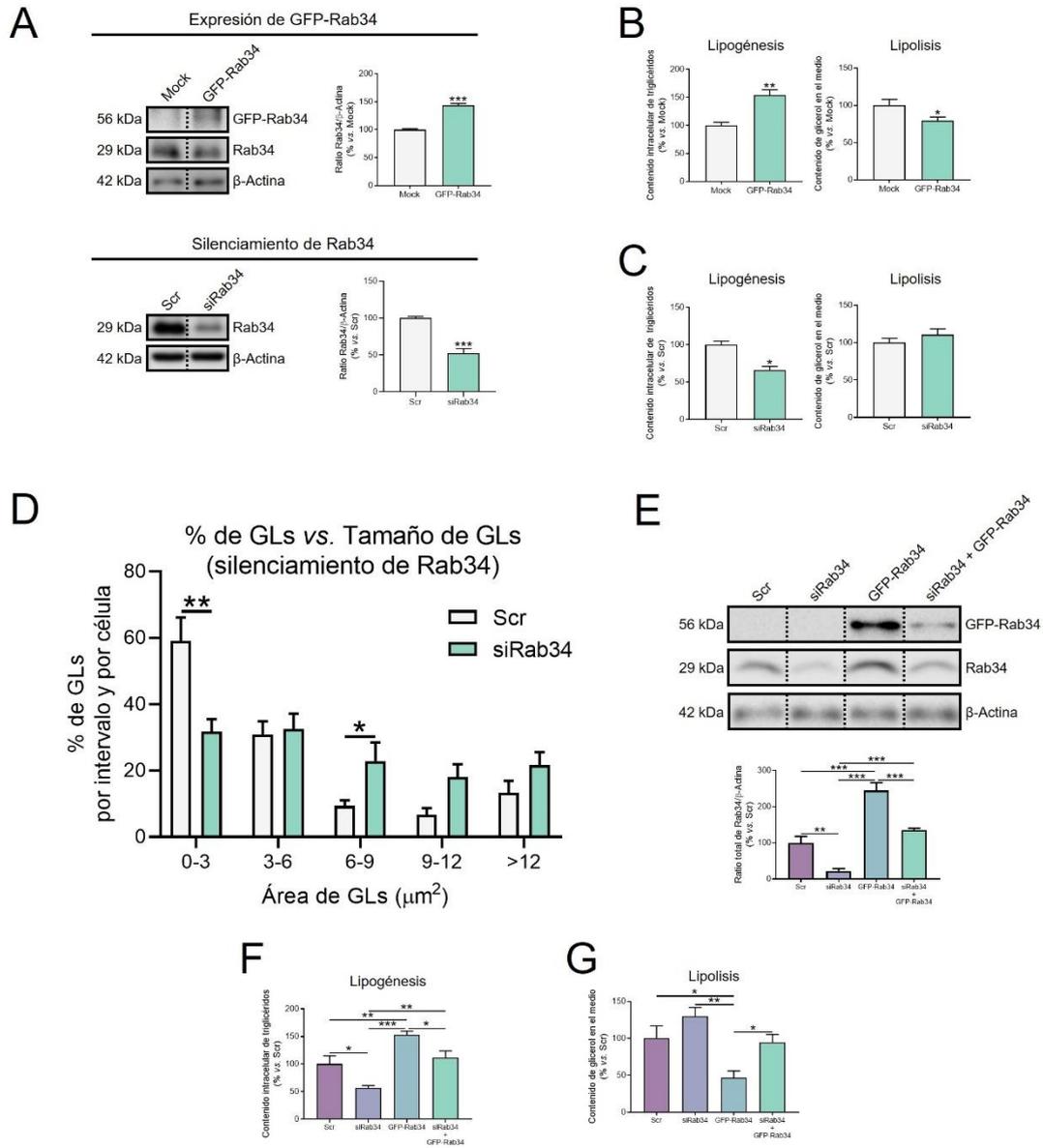


Figura 39. Validación de los experimentos de expresión y silenciamiento de Rab34 y análisis del almacenamiento y movilización del contenido lipídico en estas condiciones. (A) Análisis de *immunoblotting* cuantitativo de los niveles de proteína de Rab34 en células 3T3-L1 que expresan GFP-Rab34 o Rab34 siRNA (siRab34). Los datos son expresados como porcentaje referido a los grupos control: células transfectadas con el vector de GFP (Mock) o con *Scramble* siRNA (Scr) (100%). Los datos son referidos a los valores de las células control transfectadas con GFP o Scr (100%), y expresados como la media \pm SEM (n=3 experimentos individuales). (B, C) Cuantificación del contenido de TAGs (lipogénesis) y liberación de glicerol (lipólisis) en cada condición. Los datos son referidos a los valores de las células control (B, Mock; C, Scr) (100%) y expresados como la media \pm SEM (n=4 experimentos individuales). (D)

Histograma de distribución del porcentaje del tamaño de GLs en células 3T3-L1 transfectadas con siRab34 vs. scramble Scr. Los datos son expresados como la media \pm SEM (n=10 células/condición experimental, 2 estudios replicados). **(E)** *Immunoblots* representativos de la expresión de Rab34 y su cuantificación en experimentos de rescate. Las células fueron transfectadas con siRab34, solo o en combinación con GFP-Rab34 (recuperación de Rab34). Al final de los experimentos, las células fueron procesadas para este estudio de immunoblotting. Los datos son referidos a los valores de las células control, transfectadas con Scr (100%), y expresados como la media \pm SEM (n=3 experimentos individuales). **(F, G)** Determinación del contenido de TAGs **(F)**, lipogénesis) y liberación de glicerol **(G)**, lipolisis) en células que expresan GFP-Rab34 o siRab34, solo o en combinación (recuperación de Rab34). Los datos son referidos a los cultivos control (Scr) (100%) y expresados como la media \pm SEM (n=3 experimentos individuales). *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001.

A continuación, para profundizar en los mecanismos que median la acción de Rab34 en la acumulación de lípidos en las GLs, examinamos el efecto de la expresión o silenciamiento de Rab34 **(Fig. 39A)** sobre la regulación de marcadores de diferenciación adipocitaria (PPAR γ 1 y PPAR γ 2), así como sobre los niveles de proteínas asociadas a GL que regulan la lipogénesis (DGAT2), lipolisis (p-HSL, HSL, ATGL, el coactivador de ATGL, CGI58, y las chaperonas lipídicas, FABP4 y FABP5), y crecimiento o recambio de GLs (PLIN1 and PLIN2) (Morigny et al., 2021) **(Fig. 40)**. El análisis cuantitativo por *immunoblotting* reveló que el aumento de expresión proteica de Rab34 incrementó el contenido de PLIN1 y el descenso tanto de ATGL como FABP5 **(Fig. 40, panel izquierdo)**. Por otro lado, el silenciamiento de Rab34 redujo la expresión de PPAR γ 1 y PPAR γ 2, así como el contenido proteico de HSL total y fosforilada (i.e., activa), pero no de la ratio p-HSL/HSL **(Fig. 40, panel derecho)**.

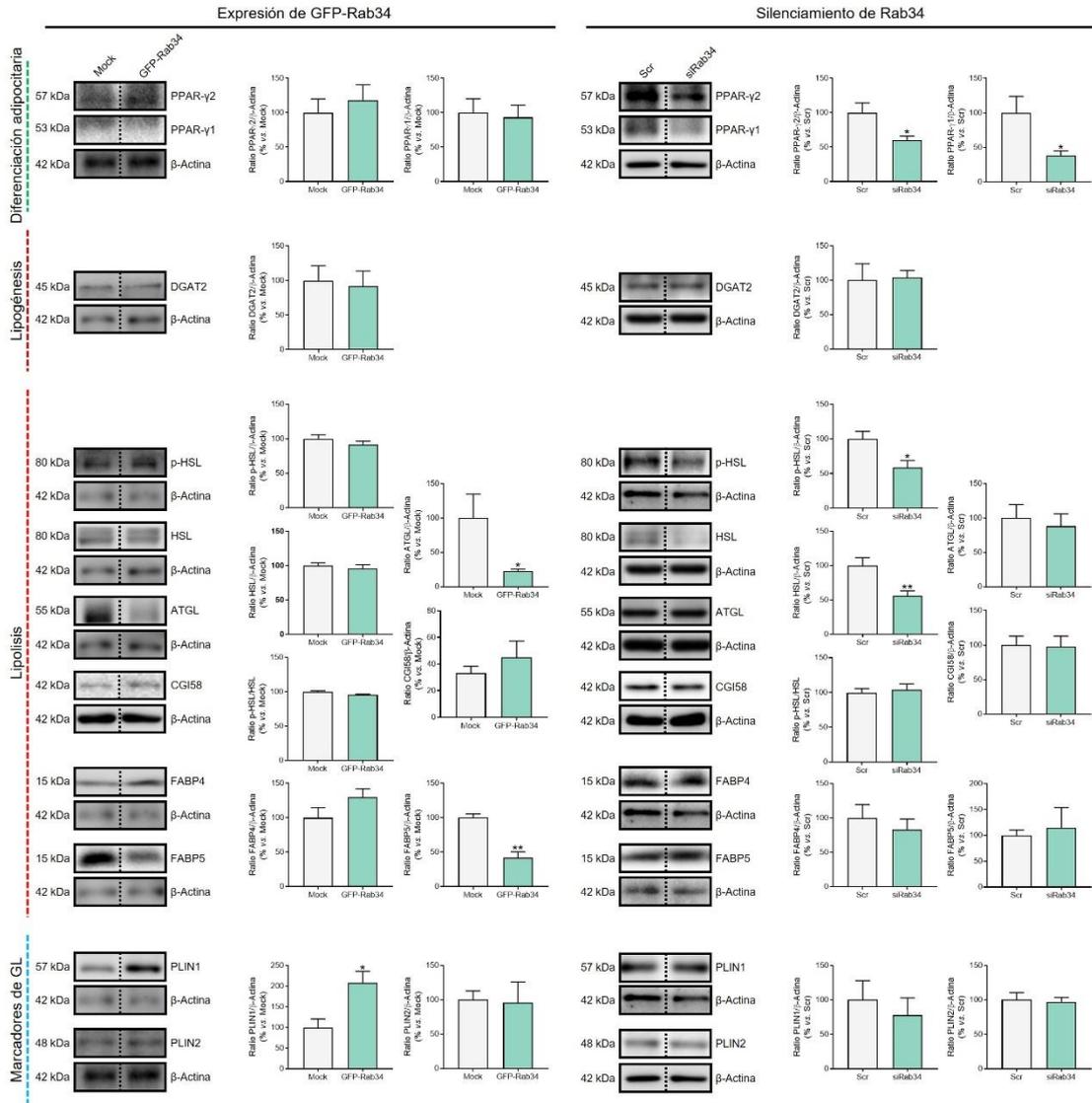


Figura 40. Efectos de la expresión y silenciamiento de Rab34 sobre marcadores de metabolismo lipídico. Cuantificación de los niveles de proteína de marcadores de diferenciación adipocitaria, lipogénesis, lipólisis, y marcadores de GL en células 3T3-L1 transfectadas con los vectores de expresión Mock (GFP) o de Rab34 (GFP-Rab34) (panel izquierdo), o Scramble (Scr) o Rab34 siRNA (siRab34) (panel derecho). Las células fueron transfectadas a día 3 y coleccionadas a día 5 (estudios de expresión) o día 6 (estudios de silenciamiento) de diferenciación. Las bandas inmunoreactivas de β -Actina de cada membrana fueron empleadas como referencia para la cuantificación de las proteínas correspondientes que fueron reveladas en el mismo *immunoblot*. Los datos corresponden a la ratio de cada inmunoseñal respecto a la inmunoseñal de su banda de β -actina y son a su vez referidos a los valores de las células control (Mock; Scr) (100%). Los datos representan la media \pm SEM (n=3 experimentos individuales). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

Similarmente, y confirmando nuestros resultados previos, la variante constitutivamente activa de Rab34 (GFP-Rab34-Q111L) tuvo los mismos efectos que los observados para la versión silvestre, incluyendo aumento de la lipogénesis y descenso de la lipólisis (**Fig. 41A**) así como una reducción del contenido de ATGL y FABP5 y un aumento de PLIN1 (**Fig. 41B**). Por otro lado, GFP-Rab34-T66N no modificó ni el contenido de estas proteínas (**Fig. 41B**) ni la lipogénesis, aunque la lipólisis fue incrementada en comparación con las células Mock (**Fig. 41A**). En conjunto, estos resultados apoyan fuertemente la implicación de Rab34 en la adipogénesis, así como en la regulación de la lipólisis.

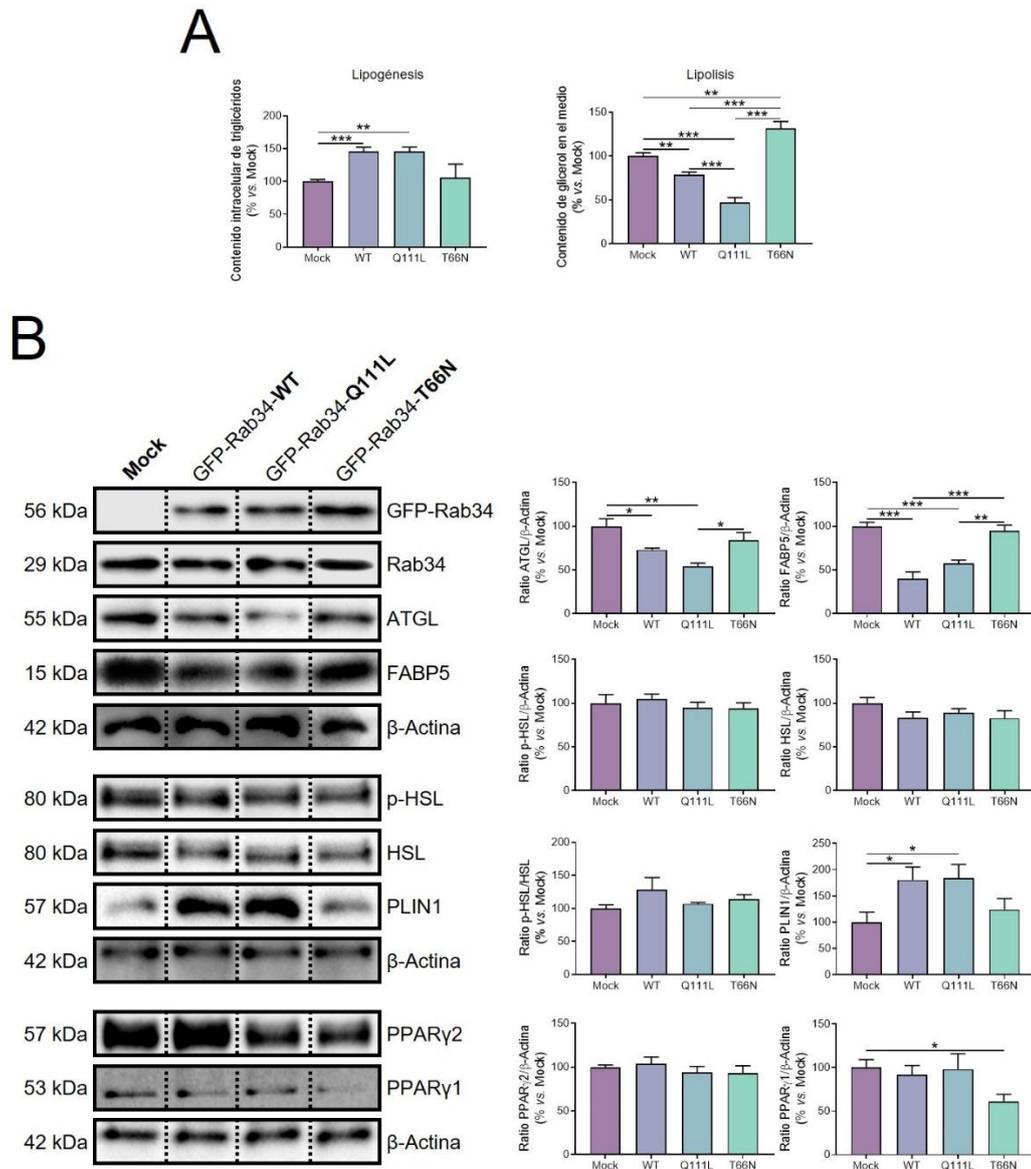


Figura 41. Caracterización de la función lipídica y de expresión de las variantes de actividad de Rab34. (A) Cuantificación de las actividades lipogénica y lipolítica en células 3T3-L1 que expresan la versión silvestre de Rab34 (wild-type, WT), la variante constitutivamente activa (Q111L) o la inactiva (T66N). (B) *Immunoblots* representativos y cuantificación de proteínas relacionadas con el metabolismo de los lípidos en células 3T3-L1 que expresan la versión silvestre de Rab34 (wild-type, WT), la variante constitutivamente activa (Q111L) o la inactiva (T66N). Los datos son referidos a los valores en las células control que expresan GFP (Mock; 100%), y son representados como la media \pm SEM (n=3 experimentos individuales). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

4.11. Interactoma de Rab34

Las funciones de las Rab GTPasas dependen de sus interacciones con conjuntos específicos de proteínas efectoras que son reclutadas en las membranas diana (Zhen and Stenmark, 2015). Los efectores de las Rabs incluyen a motores moleculares, proteínas de amarraje, quinasas, fosfatasas, componentes de sitios de contacto entre membranas y adaptadores de clasificación, así como reguladores de cada Rab [*GTP-hydrolysis activating proteins* (GAPs) y *GDP-GTP exchange factors* (GEFs)] (Homma et al., 2021).

Con objeto de identificar efectores potenciales de Rab34, empleamos estudios de BioID (Roux et al., 2012) e inmunoprecipitación usando los vectores de expresión c-Myc-BirA-Rab34 y GFP-Rab34, respectivamente, ambos seguidos por análisis de MS/MS. Basándonos en nuestros datos de expresión y silenciamiento que sugieren la implicación de Rab34 en la regulación de la lipogénesis/lipólisis, filtramos las listas de proteínas obtenidas a partir de los análisis BioID/MS e IP-MS/MS por proteínas relacionadas con el “Metabolismo de lípidos” de acuerdo con la base de datos *Reactome Pathways*. Después se compararon ambas listas para identificar proteínas coincidentes, y encontramos FABP5, FABP4, y PLIN1 como interactores potenciales de Rab34. Además, las tres proteínas habían sido también identificadas por nuestro grupo como componentes del proteoma de las GLs en adipocitos 3T3-L1 (Guzmán-Ruiz et al., 2020) (**Fig. 42A**). Por otro lado, ninguna de las enzimas lipolíticas que encontramos desreguladas en adipocitos 3T3-L1 en respuesta al silenciamiento de Rab34 y/o expresión (i.e., HSL and ATGL), fueron detectadas en estos estudios. De acuerdo con esto, los estudios dirigidos de inmunoprecipitación en

células HEK293 que coexpresan Kate-Rab34 y GFP-ATGL o GFP-HSL confirmaron la falta de interacción entre la GTPasa y las enzimas lipolíticas (**Fig. 42B**). En contraste, confirmamos la interacción entre Rab34 y FABP5, ya sea cuando c-Myc-Rab34 (**Fig. 42C**) o GFP-FAPB5 (**Fig. 42D**) son usados para los experimentos de derribo por co-IP. Por su parte, los estudios de microscopía confocal mostraron que FABP5 colocalizó con Rab34 en las GLs acumuladas en el citosol (desde el D3 en adelante) (**Figs. 42E, F**), sugiriendo que esta interacción podría ocurrir en la superficie de la GL. En conjunto, estos estudios identifican a FABP5 como un interactor potencial de Rab34 en adipocitos. Nuestros estudios también confirmaron y ampliaron publicaciones previas sobre la interacción entre FABP5 y HSL (**Fig. 42B**) (Jenkins-Kruchten et al., 2003).

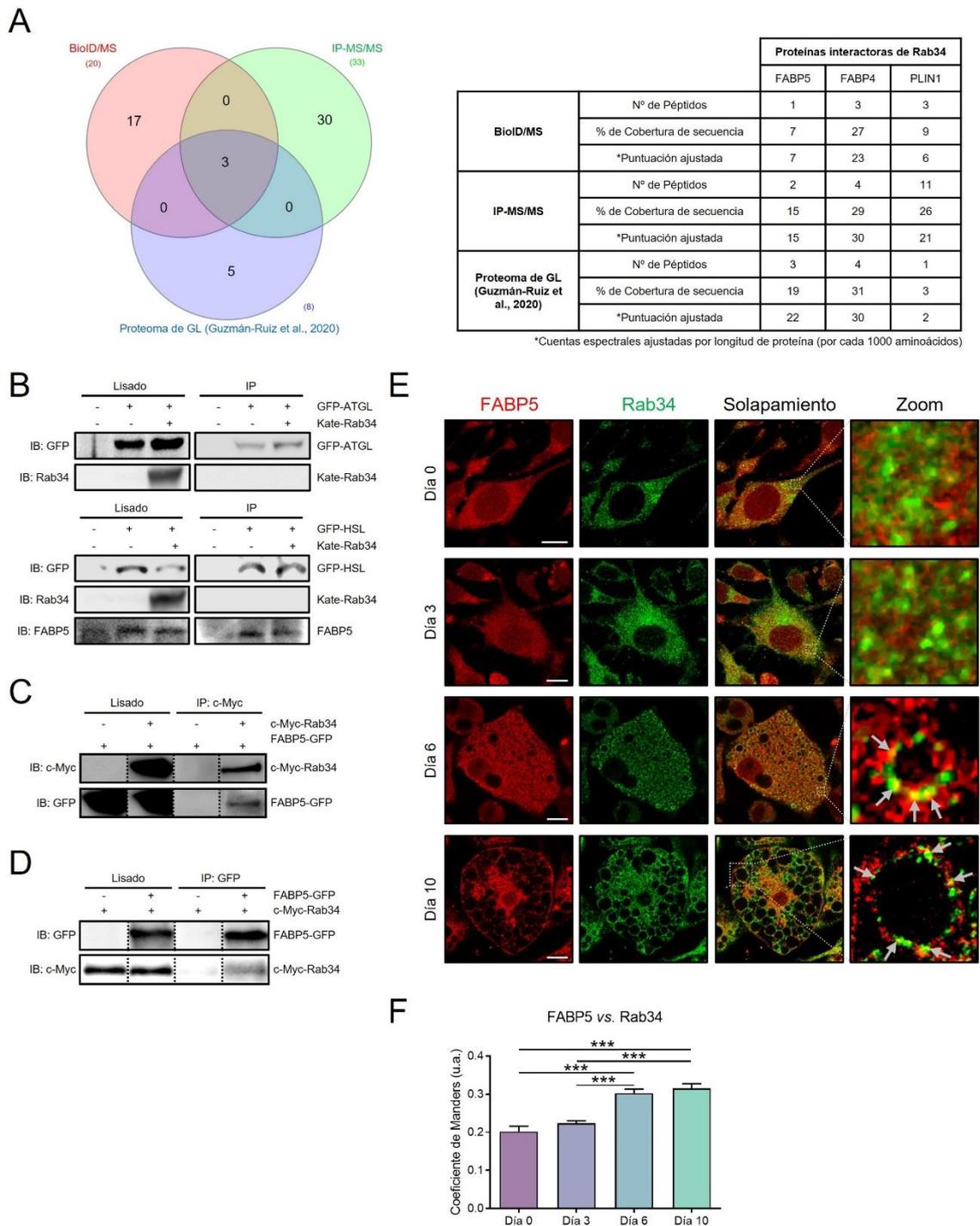


Figura 42. Identificación del interactoma de Rab34. (A) Diagrama de Venn de las proteínas que participan en la ruta del “Metabolismo de lípidos” de la base de datos Reactome Pathways que fueron identificadas por las tres aproximaciones proteómicas analizadas en este estudio: i) BioID/MS (20 proteínas), ii) IP-MS/MS (33 proteínas), y iii) Proteoma de GLs de adipocitos (8 proteínas) (Guzmán-Ruiz et al., 2020). Entre ellas, las chaperonas lipídicas, FABP4 y FABP5, y la proteína asociada a GL, PLIN1, fueron presentes en los tres conjuntos de datos proteómicos. El número de cuentas espectrales fue ajustado a la longitud de cada proteína (por cada 1000 aminoácidos). (B) Experimentos de co-IP en células HEK-293 AD que expresan Kate-Rab34 y GFP-ATGL o GFP-HSL usando *beads* unidas a anti-GFP. Tanto los lisados celulares como los

inmunoprecipitados (IP) fueron sometidos a *immunoblotting* con anticuerpos anti-GFP, anti-Rab34 y anti-FABP5. **(C, D)** *Immunoblottings* de los experimentos de co-IP en células HEK-293 AD que expresan c-Myc-Rab34 y FABP5-GFP, solos o en combinación, usando *beads* unidas a anti-c-Myc **(C)** o anti-GFP **(D)**. **(E)** Imágenes confocales representativas de células 3T3-L1 que muestran la colocalización (solapamiento) de Rab34 (verde) y FABP5 (rojo) durante la diferenciación (días 0, 3, 6 and 10). Las flechas indican la colocalización entre Rab34 y FABP5 (amarillo) en la superficie de la GL. **(F)** El coeficiente de Manders' entre Rab34 y FABP5 fue calculado para cuantificar el grado de colocalización entre ambas señales. Los datos representan la media \pm SEM (n=10 células/día de diferenciación, 2 estudios replicados). ***, P<0.001. Barra de escala, 10 μ m.

Las interacciones de Rab34 con FABP4 y PLIN1 no continuaron siendo exploradas dada la falta de efecto en los niveles proteicos de FABP4 en los estudios de expresión o silenciamiento de Rab34 **(Fig. 40)**, ni en los de PLIN1 en los experimentos que usan el inhibidor del proteasoma, MG132 **(Fig. 45)** (ver más adelante).

4.12. La interacción Rab34-FABP5 regula el recambio de lípidos en gotas lipídicas

Para obtener información sobre la interacción funcional entre Rab34 y FABP5 en la regulación de la lipólisis y/o la lipogénesis, examinamos los efectos de la coexpresión de estas dos proteínas en las actividades lipogénicas y lipolíticas de los adipocitos 3T3-L1. Como se muestra en la **Figura 43A**, la expresión de GFP-FABP5 **(Fig. 43B)** incrementó la cantidad de glicerol liberado por los adipocitos, sin cambiar la lipogénesis basal, confirmándose así el papel de esta chaperona en la lipólisis (Vogel Hertz et al., 2002). En particular, la cotransfección con GFP-FABP5 revirtió el efecto inhibitorio de la expresión de GFP-Rab34 sobre la lipólisis **(Fig. 43A)** y, en contrapartida, la acumulación de TAGs inducida por el aumento de los niveles de Rab34 disminuyó hasta los niveles control tras la expresión de FABP5-GFP **(Fig. 43A)**. Estos resultados sugirieron que la acción negativa de Rab34 sobre la lipólisis y la inducción concomitante de la acumulación de lípidos podría ser mediada, al menos en parte, a través de la reducción del contenido proteico de FABP5 mediada por Rab34. En concreto, la

expresión de Rab34 no tuvo efecto sobre los niveles de mRNA (*messenger ribonucleic acid*) de FABP5 (**Fig. 43C**).

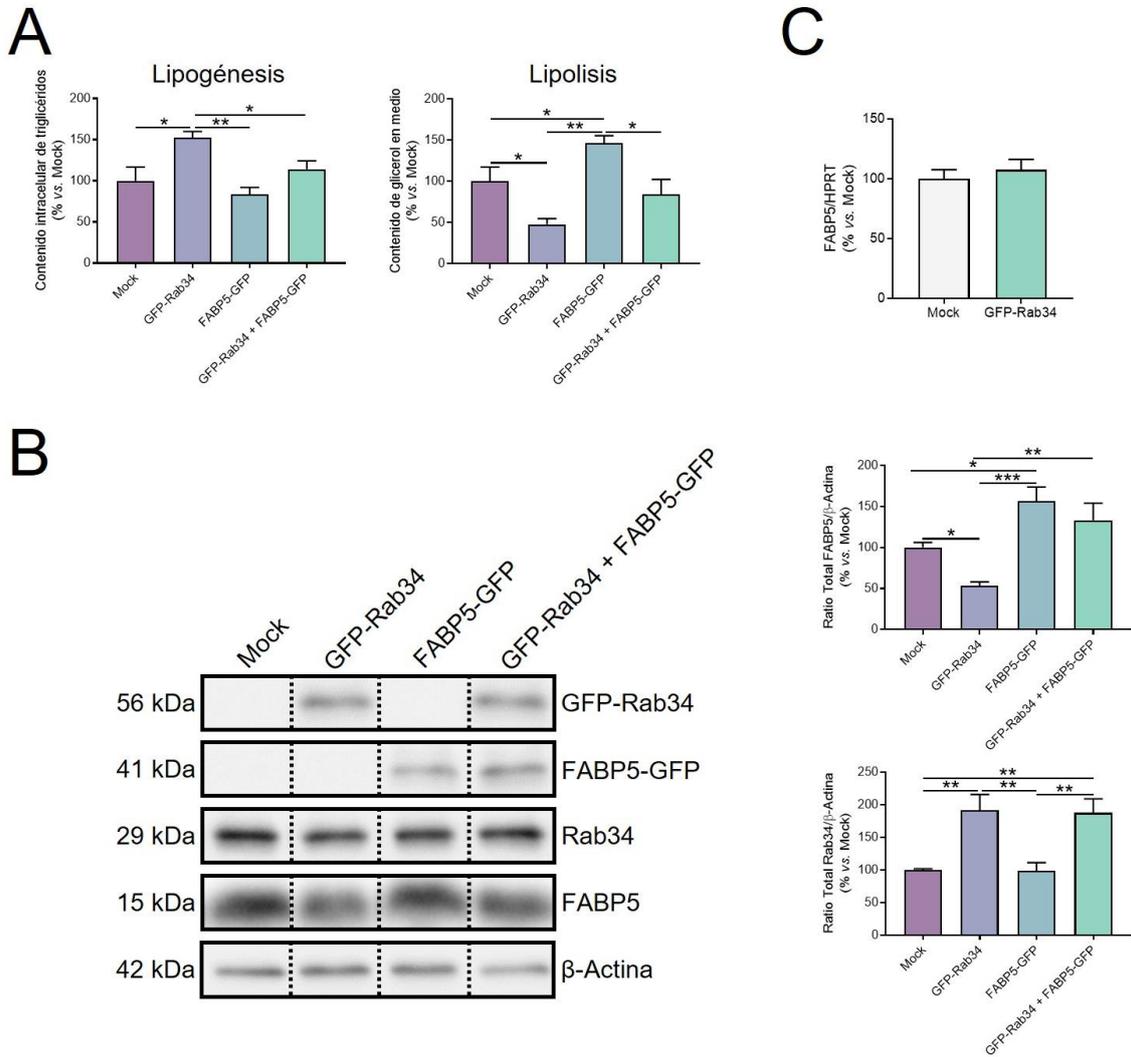


Figura 43. Las acciones de Rab34 sobre el metabolismo lipídico son mediadas por la reducción del contenido de FABP5. (A) Cuantificación de las actividades lipogénicas y lipolíticas de las células 3T3-L1 que expresan GFP-Rab34, FABP5-GFP o una combinación de ambos vectores de expresión en comparación con las células que expresan el vector de GFP vacío (Mock). (B) Análisis de la expresión de Rab34 y FABP5 en el experimento de rescate de FABP5. Se muestran *immunoblots* representativos y cuantificación de extractos proteicos de células 3T3-L1 transfectadas con los vectores de expresión que codifican GFP-Rab34 o FABP5-GFP, solos o en combinación (grupo de recuperación de FABP5). Los datos son expresados en gráficas como un porcentaje de valores y referidos a los del grupo control (células transfectadas con el vector de GFP vacío, Mock) (100%). Las gráficas muestran la ratio de cada inmunoseñal respecto de la inmunoseñal de β-actina. Los datos son expresados como la media ± SEM (n=3 experimentos individuales). (C) Análisis de RT-qPCR de los niveles de expresión del mRNA de FABP5 en células 3T3-L1 que expresan GFP-Rab34. Los niveles de mRNA de FABP5 fueron

calculados usando el método Ct y el gen *housekeeping* HPRT, y expresados como la media \pm SEM (n=3 experimentos individuales). *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001.

Después, analizamos la interacción funcional entre Rab34 y HSL. Como se mostró previamente para FABP5-GFP, la expresión de GFP-HSL (**Fig. 44B**) en adipocitos aumentó la lipólisis, aunque la lipasa también causó un descenso concomitante en el contenido de TAGs (**Fig. 44A**). El silenciamiento génico de Rab34 bloqueó los efectos inducidos por HSL sobre la lipólisis pero no sobre la lipogénesis (**Fig. 44A**). Estas observaciones, junto con nuestros estudios de inmunoprecipitación (**Fig. 42B**), sugirieron una interacción funcional entre Rab34 y HSL que depende de una interacción indirecta entre las dos proteínas.

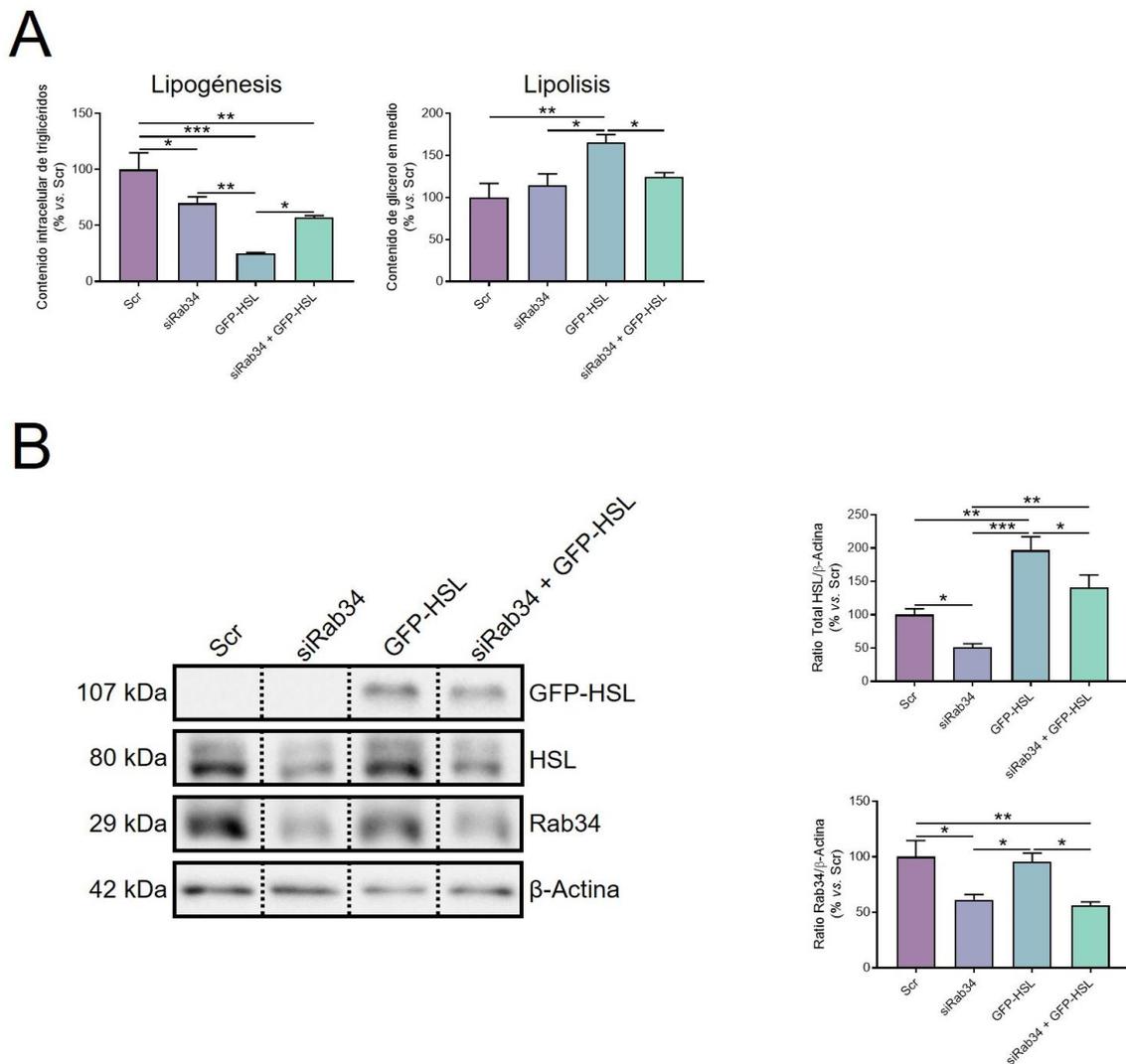


Figura 44. Las acciones de Rab34 sobre el metabolismo lipídico dependen de una interacción funcional indirecta entre Rab34 y HSL. (A) Cuantificación de las actividades

lipogénicas y lipolíticas de las células 3T3-L1 que silencian Rab34 (siRab34), expresan GFP-HSL o están transfectadas con una combinación de ambos ácidos nucleicos, en comparación con las células que expresan Scramble siRNA (Scr). **(B)** Análisis de la expresión de Rab34 y HSL en el experimento de rescate de HSL. Se muestran *immunoblots* representativos y cuantificación de extractos proteicos de células 3T3-L1 transfectadas con el siRNA que silencia Rab34 y el vector de expresión que codifica GFP-HSL, solos o en combinación (grupo de recuperación de HSL). Los datos son expresados en gráficas como un porcentaje de valores y referidos a los del grupo control (células transfectadas con Scramble siRNA, Scr) (100%). Las gráficas muestran la ratio de cada inmunoseñal respecto de la inmunoseñal de β -actina. Los datos son expresados como la media \pm SEM (n=3 experimentos individuales). *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001.

4.13. Rab34 regula la estabilidad de la proteína FABP5

La observación de que el aumento de Rab34 reducía el contenido proteico de FABP5 (**Figs. 40, 41B, 43B**), pero no los niveles de expresión génica de FABP5 (**Fig. 43C**), nos impulsó a investigar si la GTPasa puede modular la estabilidad proteica de esta chaperona. Para este fin, primero medimos los niveles proteicos de FABP5 y otras proteínas reguladas por la expresión o el silenciamiento de Rab34 en células basales o tratadas con el inhibidor del proteasoma MG132 (**Figs. 45, 46**). Como se muestra en las **Figuras 45 y 46**, el tratamiento de MG132 incrementó el contenido de proteína de FABP5, PLIN1, PPAR γ 1, PPAR γ 2, y ATGL en células control (independientemente de si se transfectaron con el vector GFP vacío o con scramble siRNA).

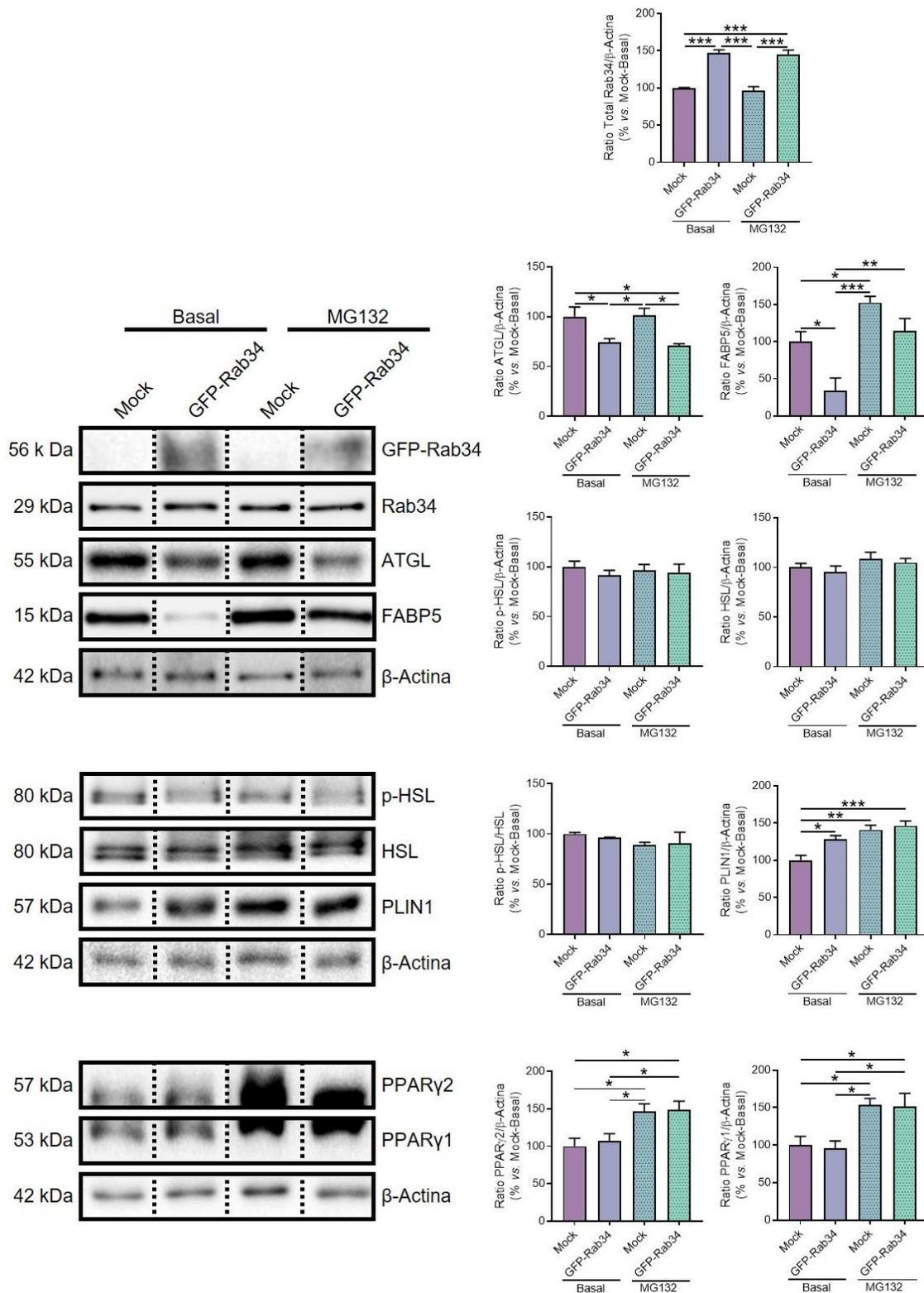


Figura 45. Análisis del contenido de proteínas reguladas por cambios en la expresión de Rab34 en células que expresan la GTPasa y están tratadas con el inhibidor de proteasoma MG132. Análisis de *immunoblotting* cuantitativo de Rab34, ATGL, FABP5, p-HSL, HSL, PLIN1, PPARγ1, y PPARγ2 en células 3T3-L1 que expresan GFP-Rab34, y están expuestas o no (Basal) al inhibidor del proteasoma, MG132 (10 μmol/L, 12 h). Las células transfectadas con el vector

vacío GFP (Mock) y en condiciones basales fueron empleadas como control. Las gráficas muestran la ratio de cada inmunoseñal referida a la inmunoseñal de la β -actina. Los datos son expresados como la media \pm SEM (n=3 experimentos individuales). *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001.

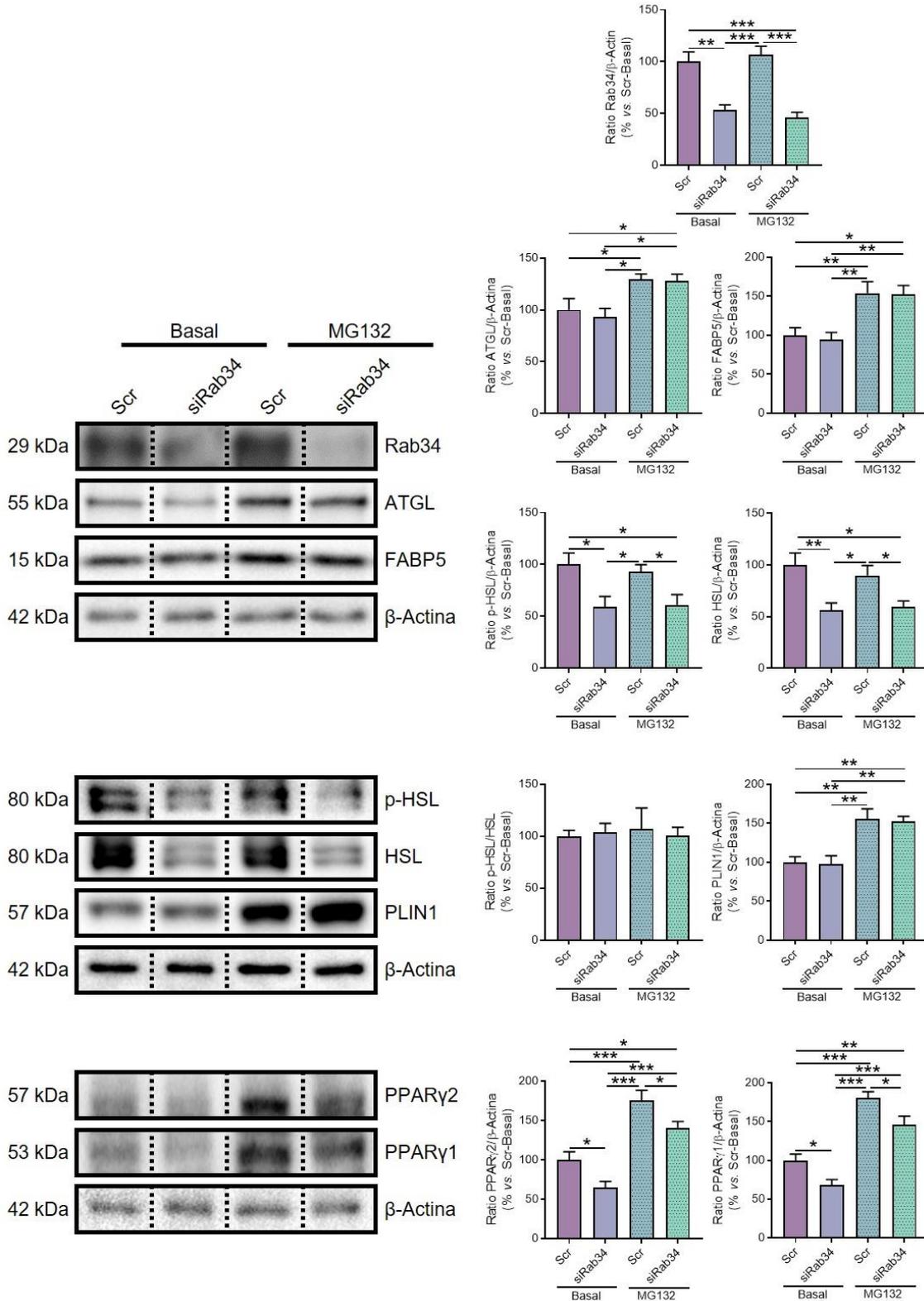


Figura 46. Análisis del contenido de proteínas reguladas por cambios en la expresión de Rab34 en células que silencian la GTPasa y están tratadas con el inhibidor de proteasoma MG132. Análisis de *immunoblotting* cuantitativo de Rab34, ATGL, FABP5, p-HSL, HSL, PLIN1, PPAR γ 1, y PPAR γ 2 en células 3T3-L1 que silencian Rab34 (siRab34), y están expuestas o no (Basal) al inhibidor del proteasoma, MG132 (10 μ mol/L, 12 h). Las células transfectadas con scramble siRNA (Scr) y en condiciones basales fueron empleadas como control. Las gráficas muestran la ratio de cada inmunoseñal referida a la inmunoseñal de la β -actina. Los datos son expresados como la media \pm SEM (n=3 experimentos individuales). *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001.

Entre las proteínas testadas, solo los niveles proteicos de FABP5 incrementaron hasta los valores control en presencia de MG132 en las células que expresan GFP-Rab34 (**Fig. 45**), sugiriendo la implicación de la GTPasa en la regulación del recambio de FABP5. Curiosamente, MG132 también revirtió los efectos de aumento de lipogénesis y descenso de lipólisis mediados por Rab34 en estas células, (**Fig. 47A**). Sin embargo, MG132 no tuvo efecto sobre la inhibición de lipogénesis causada por el silenciamiento de Rab34 (**Fig. 47B**).

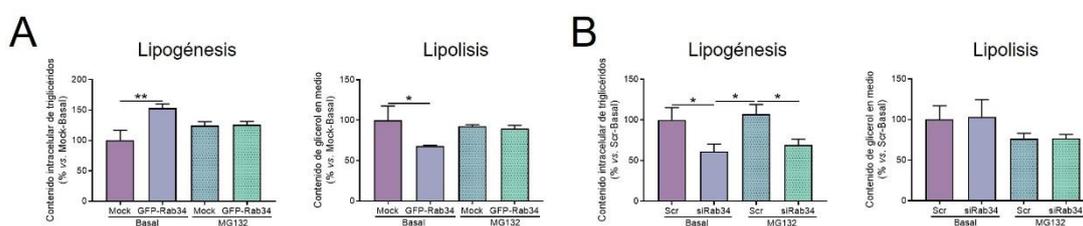


Figura 47. Las acciones de Rab34 sobre el metabolismo lipídico están reguladas por el proteasoma. (A, B) Actividades lipogénica y lipolítica de las células 3T3-L1 que expresan GFP-Rab34 (A) o siRab34 (B) y expuestas o no (Basal) al inhibidor del proteasoma, MG132 (10 μ mol/L, 12 h). Los datos son expresados como porcentaje de valores y referidos a los cultivos control (100%) (Basal; Mock/Scr). Se representan como la media \pm SEM (n=3 experimentos individuales). *, P<0.05; **, P<0.01.

Finalmente, los experimentos de silenciamiento también revelaron que MG132 revirtió parcialmente la regulación a la baja de PPAR γ en adipocitos expuestos a siRab34 (**Fig. 46**).

4.14. UBA1 participa en la acción mediada por la interacción Rab34-FABP5

Nuestros resultados previos sugirieron que las acciones de Rab34 sobre la lipólisis y lipogénesis podrían ser mediadas a través de la regulación de la ubiquitinación de FABP5 y la degradación proteasomal. Para abordar esta pregunta, expresamos FABP5, solo o en combinación con Rab34 y/o un vector de expresión que codifica para ubiquitina marcada con hemaglutinina (HA) (**Fig. 48A**). Estos experimentos se llevaron a cabo en células expuestas a MG132 para prevenir la degradación de FABP5. La cuantificación de los inmunoblots teñidos para un suero anti-HA revelaron que los niveles de FABP5 ubiquitinada fueron significativamente mayores en células que expresan Rab34 (**Fig. 48A**).

Estas observaciones nos llevaron a testar si podría haber enzimas implicadas en ubiquitinación o deubiquitinación entre los efectores potenciales de las acciones de Rab34 sobre FABP5. Para ser más específicos, comparamos las listas de proteínas obtenidas a partir de nuestros estudios de BioID e IP-MS/MS en busca de la presencia de enzimas de ubiquitinación (UBs) y/o deubiquitinación (DUBs). Entre las proteínas identificadas, encontramos: i) UBA1 (en las listas de BioID e IP-MS/MS), la cual cataliza el primer paso en la conjugación de ubiquitina para marcar proteínas celulares para la degradación (Groen and Gillingwater, 2015), ii) UCHL3 (en la lista de BioID), una ubiquitina C-terminal hidrolasa (Nijman et al., 2005), y iii) ISG15 (en la lista de IP-MS/MS), una proteína parecida a ubiquitina (Groen and Gillingwater, 2015). Notablemente, estas tres proteínas fueron también detectadas en nuestro estudio proteómico previo de GLs aisladas de adipocitos 3T3-L1 (Guzmán-Ruiz et al., 2020). Por ello, a continuación comprobamos si estas proteínas pueden interactuar con Rab34 y/o FABP5 en estudios de co-IP. Estos experimentos confirmaron que las tres proteínas pueden interactuar con Rab34, aunque sólo UBA1 interactuó con FABP5, solo o en combinación con Rab34 (**Fig. 48B**).

Después, para investigar la posible participación de UBA1 en la ubiquitinación de FABP5 y su degradación en respuesta a Rab34, evaluamos los niveles de FABP5 en extractos de proteína procedentes de adipocitos 3T3-L1 transfectados con vectores de UBA1-c-Myc y/o GFP-Rab34 en presencia o ausencia de MG132. Interesantemente, la expresión de UBA1 descendió el contenido de FABP5 de una manera dependiente de la concentración de UBA1,

especialmente en presencia de Rab34, y este efecto fue totalmente bloqueado por el tratamiento de MG132 (**Fig. 48C**).

Asimismo, la depleción de UBA1 por siRNA (82.9% respecto de los valores control) no modificó el contenido proteico de Rab34 o ATGL (**Fig. 48D; Figs. 49A-C**). Por el contrario, el silenciamiento de UBA1 previno totalmente la disminución del contenido de FABP5 mediada por la expresión de Rab34 (**Fig. 48D; Fig. 49D**).

Finalmente, los ensayos funcionales en adipocitos 3T3-L1 transfectados con siUBA1 y/o GFP-Rab34 demostraron que el silenciamiento de UBA1 previno los efectos de la expresión de Rab34 sobre la acumulación e hidrólisis de lípidos (i.e., disminuyó la lipogénesis e incrementó la lipólisis, respectivamente) (**Fig. 48E**). Tomados en conjunto, estos hallazgos proveen una fuerte evidencia para establecer una conexión funcional entre Rab34 y UBA1 en la regulación de la ubiquitinación de FABP5 y la degradación proteasomal.

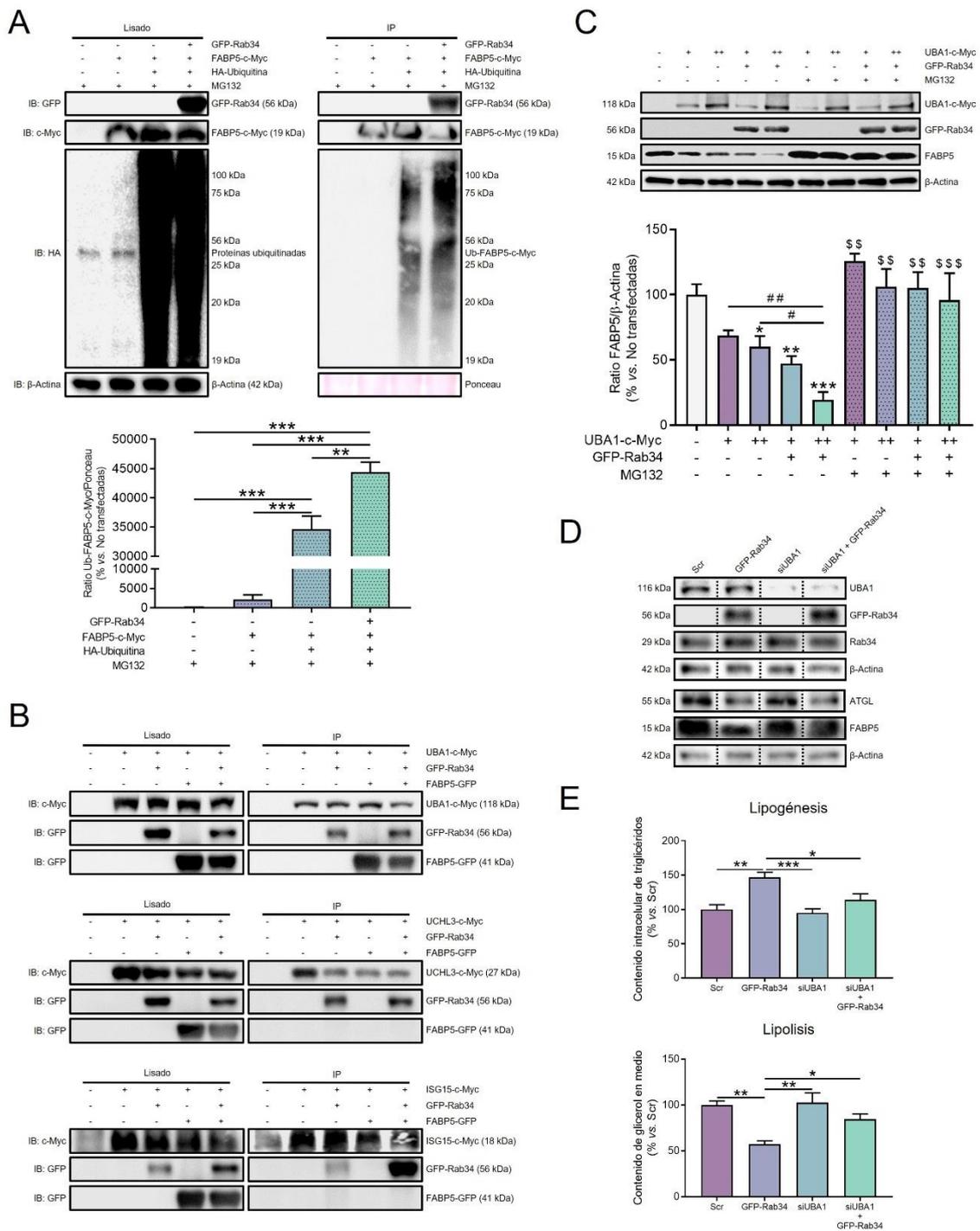


Figura 48. UBA1 transmite la acción de Rab34 sobre la estabilidad de FABP5 para regular el metabolismo lipídico. (A) Las células 3T3-L1 transfectadas con los plásmidos indicados (GFP-Rab34 o FABP5-c-Myc) fueron tratadas con MG132 (10 μ mol/L, 12 h) y lisadas bajo condiciones desnaturizantes. La fracción de FABP5 marcado con c-Myc fue purificada por inmunoprecipitación con anti-c-Myc y FABP5 ubiquitinada fue detectada por *immunoblotting*. Un vector de expresión codificante para ubiquitina marcada con hemaglutinina (HA) (HA-Ubiquitina) fue empleado para la cotransfección de células que también expresaron FABP5-c-Myc, solo o en combinación con GFP-Rab34. La gráfica muestra la ratio de la inmunoseñal de FABP5-c-Myc ubiquitinada respecto de la señal de Ponceau S. Los datos son además referidos a los valores

de las células no-transfectadas (100%) y expresadas como la media \pm SEM (n=3 individual experiments). **, P<0.01; ***, P<0.001. **(B)** Análisis de co-IP en células que expresan GFP-Rab34 y vectores que codifican proteínas asociadas a GL relacionadas con procesos de ubiquitinación/deubiquitinación: UBA1-c-Myc (panel superior), UCHL3-c-Myc (panel central), o ISG15-c-Myc (panel inferior). En cada experimento, las proteínas fueron purificadas por inmunoprecipitación con anti-c-Myc y detectadas por *immunoblot* usando anticuerpos de anti-c-Myc o anti-GFP. **(C)** *Immunoblots* representativos y cuantificación de los niveles de FABP5 en células 3T3-L1 transfectadas con GFP-Rab34 (+, 0.8 μ g/ μ L), UBA1-c-Myc (+, 0.8 μ g/ μ L; ++, 1.6 μ g/ μ L) o ambos vectores de expresión en ausencia o presencia de MG132 (10 μ mol/L, 12 h). Los datos representan la ratio de la inmunoseñal de FABP5 respecto de la inmunoseñal de β -actin y están referidos a los valores de las células no transfectadas (100%). Los datos son expresados como la media \pm SEM (n=3 experimentos individuales). *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001 vs. células no-transfectadas. \$\$, P<0.01; \$\$\$, P<0.001 vs. sus respectivas condiciones tratadas con MG132. #, P<0.05; ##, P<0.01. **(D, E)** Experimentos de rescate de FABP5 en células 3T3-L1 que expresan GFP-Rab34 y UBA1 siRNA (siUBA1), solos o en combinación. Al final de los experimentos, las células fueron procesadas para estudios de *immunoblotting* **(D)** y para medidas de lipogénesis y lipólisis **(E)**. Los datos son referidos a los valores en las células control (100%; Scr), y expresados como la media \pm SEM (n=3 experimentos individuales). *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001.

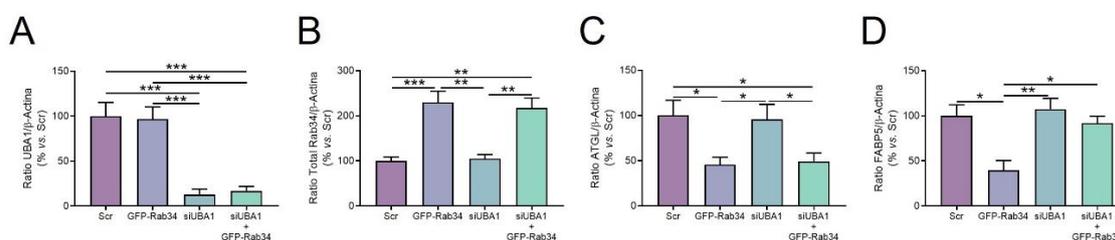


Figura 49. Cuantificaciones de *immunoblot* de extractos de proteína de células 3T3-L1 silenciadas para UBA1 (relacionadas con la Fig. 48D). Cuantificación de los niveles de proteína de UBA1 **(A)**, Rab34 **(B)**, ATGL **(C)** y FABP5 **(D)** en células 3T3-L1 transfectadas con UBA1 siRNA (siUBA1) o GFP-Rab34, solos o en combinación. Las células transfectadas con scramble siRNA (Scr) fueron empleadas como controles. Las gráficas muestran la ratio de cada inmunoseñal respecto de la inmunoseñal de β -actina. Los datos son representados como porcentaje de valores referidos a las células control (Scr) (100%) y expresados como la media \pm SEM (n=3 experimentos individuales). *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001.

4.15. Rab34 en adipocitos humanos y modelos de enfermedad

El análisis de los datos publicados en estudios de transcriptómica de TAS humano (zona abdominal) (Fagerberg et al., 2014; Lee et al., 2016) demostró

que el contenido de transcritos de Rab34 es más elevado en individuos con obesidad que en individuos delgados (**Fig. 51A**). Desde esta perspectiva, decidimos explorar si los resultados en la línea celular 3T3-L1 podrían ser también extendidos a adipocitos primarios humanos (adipocitos maduros y preadipocitos, tanto aislados en fresco como diferenciados *in vitro*). Para este fin, analizamos la localización de Rab34 en adipocitos maduros aislados de muestras de TAO y TAS obtenidas de individuos con obesidad durante procedimientos de cirugía bariátrica (**Fig. 50A**). Como se muestra en la **Figura 50A**, la mayor parte de la inmunoseñal de Rab34 colocalizó con la GL unilocular de los adipocitos maduros, aunque una débil señal residual puede ser también vista en el Golgi (más visible en adipocitos maduros de TAO). Paralelamente también exploramos la distribución de Rab34 con relación al RE y al dominio ERGIC. Observamos que Rab34 parcialmente colocalizó con *ER-Tracker* en adipocitos maduros TAS y con ERGIC53 tanto en adipocitos maduros de TAO y TAS (**Fig. 50A**).

En relación a los estudios de diferenciación *in vitro*, preadipocitos aislados de la SVF de muestras de grasa de TAO y TAS fueron cultivadas y diferenciadas a adipocitos maduros usando protocolos estándar (**Fig. 50B**) (Sánchez-Ceinos et al., 2021). En particular, analizamos la localización de la señal de Rab34 en relación a las GLs y al RE, incluyendo los subdominios del RE, ERGIC y ERES, a diferentes etapas de diferenciación (D5 y D10) (**Fig. 50B**). Independientemente del depósito de grasa, la inmunoseñal de Rab34 solapó con la superficie del marcador de GL (PLIN1). Además, una extensa colocalización de la inmunoseñal de Rab34 con *ER-Tracker* fue observada tanto en adipocitos de TAO como de TAS a lo largo de su diferenciación. Asimismo, como se observó previamente en células 3T3-L1, Rab34 se asoció con subdominios de RE en adipocitos humanos en diferenciación. De este modo, el análisis cuantitativo de colocalización entre señales en los experimentos de doble marcaje mostró un mayor solapamiento entre Rab34 y el marcador de ERES, SEC16A, que con ERGIC53, ya sea a D5 o D10 en adipocitos de TAO (**Fig. 50B**). De hecho, a D10, la colocalización Rab34-SEC16A fue más alta que con *ER-Tracker*. En adipocitos de TAS a D5, la colocalización entre Rab34 y ERGIC53 fue casi despreciable, y la mayor parte de la inmunoseñal de Rab34 solapó con SEC16A (**Fig. 50B**). A etapas tardías

de diferenciación, los adipocitos de TAS mostraron tasas similares de colocalización entre Rab34 y SEC16A o ERGIC53 (**Fig. 50B**). En células transfectadas con GFP-Rab34, la señal fue también observable en el aparato de Golgi (**Fig. 50B**), como también observamos en las células 3T3-L1 (**Fig. 33**).

También evaluamos la expresión de Rab34 en diferentes modelos de obesidad murinos. En este contexto, primero analizamos el contenido de la proteína Rab34 en el tejido adiposo blanco de ratones obesos inducidos por dieta o manipulación genética (**Figs. 50C, D**). La cuantificación mostró que los niveles de Rab34 se incrementaron 2,7 veces en los extractos de proteína de tejido adiposo blanco de ratones alimentados con una HFD en comparación a los alimentados con una STD (**Fig. 50C**). Similarmente, los niveles de Rab34 aumentaron 2,8 veces en extractos de proteína de tejido adiposo blanco de ratones ob/ob, en comparación con los WT (**Fig. 50D**). Estos resultados, junto con los previamente representados mostrando el papel de Rab34 en la función adipocitaria, indican que la expresión de Rab34 en el tejido adiposo está directamente relacionada con el desarrollo de obesidad, comportándose como un biomarcador de esta enfermedad.

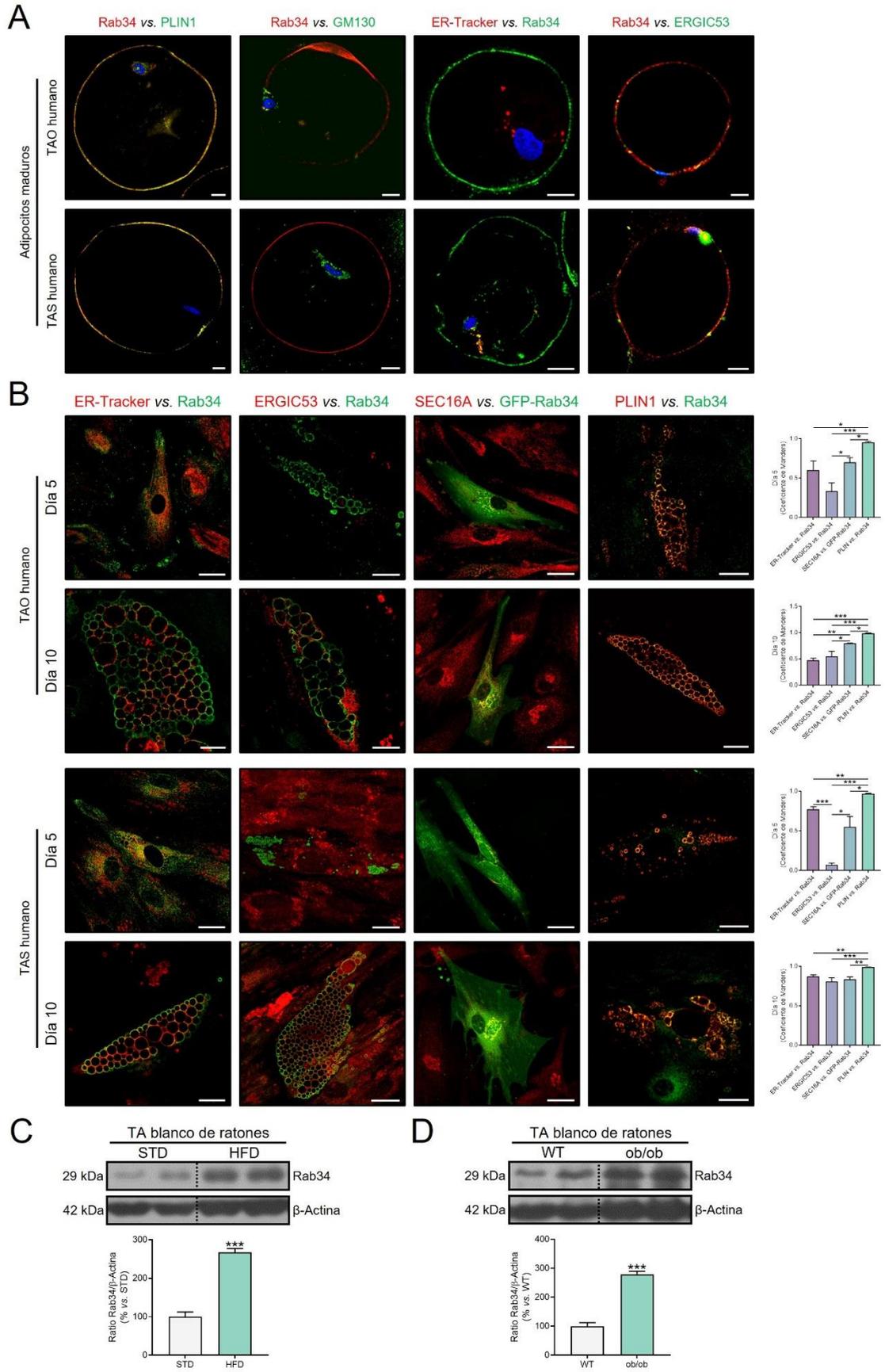


Figura 50. Caracterización de Rab34 en adipocitos humanos y modelos animales de obesidad. (A) Imágenes representativas de microscopía confocal de adipocitos maduros aislados de TAO y TAS humanos doblemente-inmunoteñidos con el anticuerpo anti-Rab34 y anticuerpos contra PLIN1, GM130, y ERGIC53 o marcados con *ER-Tracker*. (B) Imágenes representativas de microscopía confocal de preadipocitos humanos de TAO y TAS a diferentes días de diferenciación (D5 y D10). Las células fueron incubadas con el anticuerpo anti-Rab34 y anticuerpos contra ERGIC53 o PLIN1, o con la tinción de *ER-Tracker*. Para la detección de los ERES, las células que expresan GFP-Rab34 fueron incubadas con anti-SEC16A. Los coeficientes de Manders' fueron calculados para evaluar la colocación entre señales. Los datos son expresados como la media \pm SEM (n=13 células/día de diferenciación, 2 estudios replicados). (C, D) *Immunoblots* representativos y cuantificación de los niveles de Rab34 en muestras de tejido adiposo blanco procedentes de ratones alimentados con dieta STD vs. HFD (C), y ratones WT vs. ob/ob (D). Los datos son referidos a los valores de los ratones control (100%), y expresados como la media \pm SEM (n=6). *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001. Barra de escala, 10 μ m.

Finalmente, basándonos en los resultados obtenidos en los modelos humanos y animales, decidimos testar si, a parte de los cambios en el contenido de Rab34, la localización de esta GTPasa puede estar también afectada bajo condiciones de obesidad. Para este fin, empleamos un modelo de cultivo 3D de adipocitos previamente validado por nosotros que mimetiza el microambiente fibrótico encontrado en el tejido adiposo de individuos con obesidad y resistencia a insulina (Guzmán-Ruiz et al., 2020). Como se muestra en la **Figura 48B**, los cultivos de adipocitos 3T3-L1 en COL-I-basados microgeles 3D enriquecidos en el proteoglicano, lumican (i.e., condiciones de obesidad), indujeron una disminución en el número de GLs inmunoteñidas para Rab34, aunque no se observaron cambios en la inmunoseñal total de Rab34 por célula. En conjunto, estas observaciones sugieren que los insultos relacionados con la obesidad pueden modificar la asociación de Rab34 a las GLs.

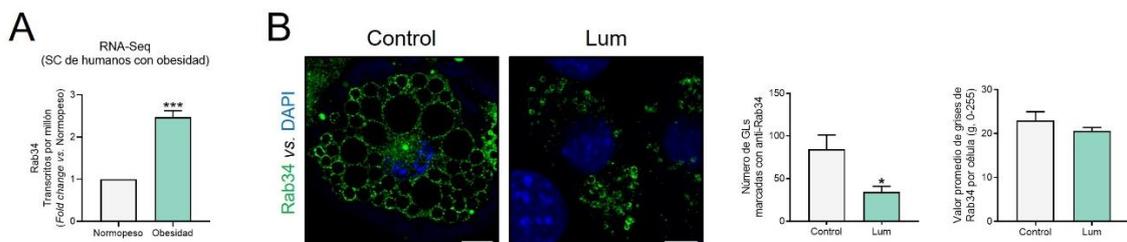


Figura 51. Niveles de expresión de Rab34 en tejido adiposo humano y regulación de Rab34 en respuesta a insultos obesogénicos. (A) Los niveles de expresión de Rab34 en muestras de TAS de individuos con normopeso (delgados; n=5) u obesidad (n=12). La gráfica representa los datos de transcriptómica manualmente curados de trabajos publicados previamente (Fagerberg et al., 2014; Lee et al., 2016). ***, $P < 0.001$. (B) Análisis de la unión de Rab34 a las GLs en adipocitos 3T3-L1 diferenciados en cultivos 3D que mimetizan la fibrosis del tejido adiposo. Imágenes representativas de microscopía confocal de células 3T3-L1 crecidas en matrices de colágeno-I en ausencia (Control) o presencia de lumican (30 ng/ml) (Lum) e inmunoteñidas para Rab34 (verde) y contrateñidas con DAPI (azul) para identificación de núcleos. Se realizaron análisis morfométricos del número de GLs marcadas por Rab34 y la intensidad del inmunomarcaje de Rab34 por célula, usando ImageJ. *, $P < 0.05$. Barra de escala, 10 μm .

Discusión

5. DISCUSIÓN

PRIMER ESTUDIO: *Análisis de los sitios de contacto inter-orgánulos en adipocitos normales y disfuncionales usando la pequeña GTPasa, Rab18, como un modelo molecular*

En obesidad, los adipocitos están expuestos a numerosos estímulos patológicos externos, como fibrosis, concentraciones constantemente elevadas de glucosa e insulina o inflamación, lo que, junto con el daño provocado por el exceso de lípidos en el interior del adipocito, provocan la disfunción de orgánulos intracelulares como el RE (Fernandes-da-Silva et al., 2021; Kawasaki et al., 2012; Tripathi and Pandey, 2012), o las mitocondrias (Tripathi and Pandey, 2012). Además, está claramente establecido que las condiciones citadas traducen la activación de procesos de estrés, como el estrés del RE o estrés oxidativo al interior del adipocito (Fernandes-da-Silva et al., 2021; Kawasaki et al., 2012; Tripathi and Pandey, 2012). Sin embargo, se desconoce cómo estos procesos afectan a la estructura de estos orgánulos y, más notablemente, a las interacciones que se establecen entre estos y otros compartimentos celulares, como las GLs y los peroxisomas, orgánulos fundamentales en la funcionalidad del adipocito.

En el presente trabajo, hemos realizado una caracterización inicial de los sitios de contacto que se establecen entre algunos de los orgánulos membranosos intracelulares de las células especializadas en almacenar lípidos, los adipocitos, tanto en condiciones de salud como de enfermedad metabólica, que puede conllevar la pérdida de la homeostasis lipídica. En concreto se ha establecido el perfil de MCSs en la interacción RE-GLs (para el almacenamiento y liberación controlada de lípidos) y RE-peroxisomas (para la síntesis y metabolismo de los lípidos) en condiciones basales y en condiciones de fibrosis, IR e inflamación, que se asocian a la obesidad (Fernandes-da-Silva et al., 2021; Tripathi and Pandey, 2012). Para ello se ha analizado el número y tamaño de dichos contactos, así como el grado de colocalización, entre ambos orgánulos y su interacción con la GTPasa Rab18, de la que ya se ha descrito su asociación en el contacto RE-GL (Li et al., 2019; Xu et al., 2018), así como su presencia abundante en peroxisomas (Gronemeyer et al., 2013) y en el contacto RE-peroxisoma (Just and Peränen, 2016). Mientras Rab18 participa en el contacto

RE-GL para mantener la homeostasis y crecimiento de la GL, manteniéndola unida a RE, ya sea en células 3T3-L1, COS7, HeLa y HEK-293-T (Li et al., 2019; Xu et al., 2018), en el contacto RE-peroxisomas la GTPasa parece no tener una función estructural, si no que puede observarse en estos sitios ya que su tránsito a los peroxisomas ocurre a través del contacto directo con el RE en hepatocitos Huh7 (Gronemeyer et al., 2013). De hecho, se ha sugerido que Rab18 tiene un papel en los peroxisomas donde coordina la lipólisis de las GLs con la oxidación de ácidos grasos peroxisomal, contribuyendo al contacto de ambos orgánulos (Gronemeyer et al., 2013). Además, Rab18 puede aumentar el número de peroxisomas aislados (no unidos a RE) en su estado inactivo (unida a GDP) y mantener la estructura del RE (que se fragmenta en ausencia de Rab18), al menos en *Saccharomyces cerevisiae* (Just and Peränen, 2016).

En este sentido, definir la importancia de Rab18 en los orgánulos mencionados y en la intersección RE-GL/peroxisoma en adipocitos podría constituir a esta GTPasa como una posible diana terapéutica en el tratamiento de la obesidad y las patologías relacionadas.

Para analizar el perfil de MCSs en fibrosis, se utilizó un modelo 3D donde las células 3T3-L1 se diferenciaron *in vitro* a adipocitos (día 8, adipocito maduro). En dicho modelo se observó un aumento del estrés de RE en presencia de lumican, el cual se manifestó en nuestros estudios por un aumento: i) del contenido de BIP, una chaperona que se sobreexpresa en estas condiciones para proteger contra el plegamiento anormal de proteínas (Howarth et al., 2012); ii) de la fragmentación del RE. El proceso de estrés de RE ha sido relacionado recientemente con la aparición del estado fibrótico (Klymenko et al., 2019). Más aún, la fragmentación del RE ha sido relacionada directamente con patologías asociadas a la obesidad, como la esteatosis hepática. En este caso particular, se ha demostrado que los factores estresantes de RE, como el alcohol, disminuyen la movilidad de BIP (Howarth et al., 2012). También se ha observado que la fragmentación de RE está implicada en patologías endocrinas y en el control de la ingesta, afectando el patrón de secreción de proteínas séricas, como las albúminas, VLDL y tiroglobulina (Di Jeso et al., 2003). Este último efecto podría estar vinculado a los cambios que se producirían en el tráfico de

proteínas regulado por el Ca^{2+} , que ocurre entre el RE y el Golgi, lugar donde estas proteínas maduran después de su traducción (Di Jeso et al., 1998).

En nuestro modelo, la fragmentación del RE se asocia con un menor tamaño de GLs en presencia de lumican. Dado que la biogénesis de GLs sucede en el RE (Wilfling et al., 2014a), esta observación sugirió a priori que la fibrosis y, en especial la presencia de lumican, podrían originar un cambio en el contacto RE-GL. Esta hipótesis fue confirmada posteriormente por los estudios de localización llevados a cabo en el modelo de fibrosis para RE (*ER-Tracker*) y GL (PLIN1). Estos estudios mostraron un aumento del tamaño del contacto RE-GL en presencia de lumican, sin afectarse la cantidad de contactos del mismo. Dichos resultados parecen evidenciar que el menor tamaño de las GLs podría ser debido, en parte a una disminución de la gemación y del crecimiento de las GLs, desencadenados por la fibrosis de la MEC, que favoreció la fragmentación de RE. Asimismo, la ausencia de GLs en expansión indicaría que la colocalización observada solo se debe a GLs de pequeño tamaño, presumiblemente GLs nacientes, en contacto con los fragmentos de RE de los que no pueden separarse. Este impedimento podría deberse a una falta de suficiente superficie y tensión de la membrana del RE, que dificultaría que esas GLs de nueva formación puedan gemar del RE (Heid et al., 2014).

De un modo similar estudiamos si la fibrosis y la fragmentación de RE derivada de la misma, afectaban al contacto RE-peroxisoma. En este caso, los estudios de localización mostraron una disminución del número de peroxisomas en presencia de lumican, relacionada con una disminución del número de contactos RE-peroxisoma de mayor grado de colocalización entre sus marcadores. Estos resultados sostienen la hipótesis de que, en condiciones de fibrosis, no solo ocurre una inhibición parcial de la biogénesis de peroxisomas que no pueden separarse del RE, sino que, además la cantidad de peroxisomas que se sintetizan también está afectada. Probablemente esto se deba a la alteración de la cantidad o actividad de proteínas estructurales de la membrana del peroxisoma, que maduran postraduccionalmente en RE (en este caso fragmentado) por glicosilación (Wang et al., 2014). Así, en el RE, se han observado algunas proteínas estructurales de la membrana del peroxisoma, como Pex2p y Pex16p, que son cruciales para marcar inicialmente dominios para

la síntesis de peroxisomas, desde los cuales posteriormente gemarán una vez formados (van der Zand et al., 2006).

Por otro lado, los peroxisomas gemados pueden volver a contactar temporalmente con RE para concluir la síntesis de plasmalógenos, transfiriéndole a éste lípidos pre-plasmalógenos, cuya principal función es prevenir del efecto lipotóxico de la oxidación de lípidos de membrana (Castro et al., 2018). Así, el aumento del área de contacto RE-peroxisoma podría deberse a un efecto compensatorio, no solo para paliar la pérdida de contactos debida a la disminución de la biogénesis de peroxisomas, sino también para favorecer la síntesis de plasmalógenos que protejan a la célula del estrés oxidativo propio de la fibrosis. De hecho, se conocen patologías que manifiestan una reducción de la síntesis y número peroxisomas (como el Síndrome de Zellweger que cursa con pexofagia y fibrosis hepática) (Castro et al., 2018), defectos de la biogénesis de peroxisomas (que no pueden separarse del RE, como en el caso de Trastornos del espectro de Zellweger) (Castro et al., 2018; Waterham et al., 2016) y una pérdida masiva del contacto RE-peroxisomas (como la leucodistrofia, distrofia retiniana y ataxia) (Castro et al., 2018). Si bien ya se había postulado que la ganancia de este contacto podría llegar a observarse (Castro et al., 2018), éste es el primer trabajo donde se demuestra que el aumento de contactos RE-peroxisomas se asocia a una patología, la fibrosis derivada de obesidad. Por tanto, conocer el grado de maduración de los peroxisomas unidos al RE podría aclarar si dicha conjunción tiene un sentido negativo (consecuencia patológica) o positivo (efecto compensatorio) sobre la progresión de la fibrosis derivada de obesidad.

En relación a la GTPasa Rab18, ésta ha sido ampliamente estudiada por nuestro laboratorio. Se ha demostrado que temporalmente puede localizarse en los puntos de contacto entre el RE y las GL, donde tiene un papel importante en la correcta biogénesis de GLs (Dejgaard and Presley, 2019). En concreto, Rab18 ha sido implicada en el anclaje entre RE y GLs nacientes para transferirles lípidos sintetizados por la sintasa de ácidos grasos con la que forma un complejo (Dejgaard and Presley, 2019). Por otro lado, la formación de las conexiones tipo ERES, entre RE y GLs separadas previamente del RE (GLs en expansión) también está medida por Rab18, donde participa en la transferencia de cargos

a la GL, principalmente lípidos y enzimas para la síntesis de lípidos en la propia GL (Dejgaard and Presley, 2019). Además, se ha propuesto que los contactos RE-GL pueden ser el punto de acceso de la propia Rab18 a la GL en formación (Salo et al., 2019), en un proceso dependiente de seipin (Li et al., 2019; Salo et al., 2019). Una vez alcanzada la GL, Rab18 lleva a cabo sus funciones lipogénicas/lipolíticas (Pulido et al., 2011). Así, tanto la biogénesis como la entrada de Rab18 a la GL están mediadas por seipin (Salo et al., 2016). De hecho, la disminución de la expresión de seipin ha sido asociada a una menor colocalización de Rab18 en RE, debido a la alteración del tráfico de Rab18 a GLs nacientes o en expansión, o a la retención en la monocapa de los ERES (Li et al., 2019). Curiosamente, estudios previos de nuestro laboratorio concluyeron la disminución de la expresión de seipin en presencia de lumican en nuestros cultivos 3D. Al analizar en este trabajo la colocalización de Rab18 frente a GL en el modelo de fibrosis, se encontró un aumento del tamaño de colocalizaciones entre los marcadores de Rab18 y RE en presencia de lumican, así como de su grado de colocalización. Sin embargo, el número de colocalizaciones y el grado de colocalización de Rab18 con GL fueron significativamente menores en alta concentración de lumican (30 ng/mL). Estos resultados sugirieron que, en condiciones de fibrosis, el acceso de Rab18 a GL está parcialmente impedido, debido a su retención en los puentes RE-GL, de los que las pequeñas GLs nacientes no se están separando, a lo que podría contribuir la disminución de la expresión de seipin, desencadenada por la condición de fibrosis (Li et al., 2019). Esta hipótesis se vio reforzada por el hecho de que la triple colocalización Rab18-GL vs. RE aumentó de manera dependiente de la dosis de lumican. Además, en general, las GLs más pequeñas eran más abundantes en concentraciones crecientes de lumican, al contrario que las más grandes, supuestamente escindidas del RE en su mayor parte (i.e., GLs en expansión). Adicionalmente, el número de GLs teñidas por Rab18, es inferior en células expuestas a alta concentración de lumican.

En el modelo de IR, el patrón de colocalización observado consistió en un aumento de la colocalización entre RE-GLs, y Rab18-GLs, respecto a la condición basal. Por su parte, el tamaño y grado de colocalización entre los sitios de colocalización entre Rab18 y RE aumentaron. En conjunto, estos resultados

proponen que, en situaciones de resistencia a insulina, el RE recluta más Rab18 que en condiciones basales, y que las GLs podrían ver dificultada su gemación del RE, pero debido a un proceso que no impide el acceso de Rab18 a la GL, ya que, de hecho, su localización en GL también aumenta. Además, el acceso de Rab18 a los peroxisomas no se vio modificado por la IR, y se confirmó su asociación por primera vez en adipocitos. La unión de Rab18 a la membrana de peroxisomas ya había sido sugerida en hepatocitos con GLs, donde se le ha otorgado un papel coordinador de la lipólisis cuando se produce el contacto Rab18-GL-peroxisoma (Gronemeyer et al., 2013). En relación al contacto RE-peroxisoma, la frecuencia de contacto y colocalización entre RE-peroxisomas aumentó, posiblemente por el aumento del tamaño del RE, aunque no se afectó la asociación de Rab18 a este contacto. Además, la IR disminuyó la expresión catalasa, lo que podría ser consecuencia del aumento del contacto RE-peroxisoma, que estaría inhabilitando la capacidad neta de los peroxisomas de llevar a cabo su función antioxidante, y reprimiendo de manera indirecta la expresión de esta enzima. Por otro lado, los niveles de CHOP aumentaron, lo que podría estar relacionado con la puesta en marcha de estrés de RE, que la expansión de RE producida en estas células está tratando de compensar.

Por otro lado, en el modelo de inflamación (inducido por TNF α), también aumentó el contacto RE-GL, de una manera no dependiente de la integridad del RE, que no se vio afectada en esta condición. No obstante, para comprobar si es debido al defecto de la biogénesis de GLs, estos resultados deben ser contrastados en ambos modelos evaluando el número y tamaño de GLs, y la expresión de seipin.

Por otra parte, la ganancia o pérdida de contacto entre el RE y los peroxisomas ha sido asociada a patologías metabólicas (Castro et al., 2018). Su estudio morfométrico en condiciones de inflamación, mostró un aumento en la colocalización entre RE y peroxisomas, al igual que ocurrió en IR. La ganancia de este contacto ha sido atribuida en algunos casos al aumento de expresión de proteínas ACBD5 y VAP, que en condiciones normales, en mamíferos, secuestran a los peroxisomas en el RE para conseguir un reparto equitativo durante el ciclo celular (Schrader et al., 2020). Esta alteración modificaría, además, al alza el patrón normal de éter-fosfolípidos y plasmalógenos, lo que podría explicar que este cambio de MCSs no se haya relacionado aún con ningún

estado patológico conocido, al menos en el único estudio realizado en células Cos-7 (Costello et al., 2017). Por su parte, la pérdida del contacto RE-peroxisoma sí ha sido relacionada con enfermedades peroxisomales, como la condrodisplasia rizomélica punctata, que cursa con bajos niveles de plasmalógenos y el acortamiento sistémico de los huesos proximales, convulsiones, infecciones recurrentes del tracto respiratorio y cataratas congénitas (González-Ortiz et al., 2017). No obstante, también existe la posibilidad de que el aumento de contacto RE-peroxisoma observado en IR e inflamación se deba a alteraciones en la biogénesis de peroxisomas. En estos desórdenes clínicos se han encontrado defectos en las proteínas Pex16, HSD17B4 y ACOX1 (Castro et al., 2018), aunque no se observaron cambios en la cantidad ni en el tamaño de los peroxisomas ni en IR ni en inflamación de adipocitos.

Para confirmar uno de los dos supuestos (aumento del contacto entre peroxisomas maduros con RE para sintetizar más plasmalógenos, o defecto en la biogénesis de peroxisomas) será necesario medir metabolitos como la cantidad de EROs (especies reactivas de oxígeno) y plasmalógenos (Castro et al., 2018). De hecho, en el caso concreto de la inflamación, se ha propuesto que el aumento de la síntesis de plasmalógenos, compensa precisamente el estrés lipotóxico que padecen las células, al menos en la enfermedad de arteria coronaria (Hadj Ahmed et al., 2017).

Finalmente, en condiciones de inflamación se observaron cambios en la colocalización Rab18-RE y Rab18-peroxisomas. Así en las células tratadas con TNF α se observó una disminución del número de contactos Rab18-peroxisomas, lo que podría estar ocurriendo por su asociación a otros orgánulos, como por ejemplo el RE, ya que la gemación de GLs desde el RE podría estar dificultada y Rab18 juega un papel en el contacto RE-GL.

Esta última suposición se ve reforzada por el estudio funcional de Rab18 llevado a cabo en este trabajo. En él se observa que al silenciar Rab18, se fragmenta el RE y aumenta el grado de colocalización RE-peroxisoma (sin afectarse la cantidad y tamaño promedio de los peroxisomas). Siendo, en concreto, los peroxisomas pequeños y medianos los que se unen con menos frecuencia al RE (menor colocalización RE-peroxisoma) y se encuentran más distantes del

mismo, al contrario que los grandes, que presumiblemente llevan a término su maduración en RE. Estos resultados sugieren que la expresión de Rab18, podría ser crítica para que se desarrolle otro contacto que no implica al peroxisoma, el cual podría ser el contacto RE-GL, en el que participa necesariamente Rab18 (Li et al., 2019; Salo et al., 2019; Xu et al., 2018) al menos para llevar a cabo su función lipogénica (Pulido et al., 2011). En este sentido se ha demostrado que el silenciamiento de Rab18 reduce la aparición de pequeñas GLs nacientes, aunque sólo en células carentes de seipin (Salo et al., 2016). A su vez las células carentes de seipin, pero no de Rab18, mostraban a la GTPasa activa unida a las pequeñas GLs nacientes, en los dominios RE-GL por los que presumiblemente accede a GL (Salo et al., 2019).

Para estudiar aquellos subdominios de RE (ERGIC o ERES) que emplean las proteínas Rab para acceder a GLs (Walther y Farese, 2012). Se estudió el tráfico de Rab18 a lo largo de la diferenciación de adipocitos humanos NG procedentes de los dos depósitos grasos principales TAO y TAS. Para ello, los preadipocitos se aislaron a partir de muestras de tejido adiposo procedente de cirugía bariátrica, y se diferenciaron *in vitro* mediante la administración de un cóctel hormonal. Así hemos podido demostrar que la vía preferente para el tráfico de Rab18 hasta la superficie de la GL es la vía ERGIC, en TAO y TAS, tanto en etapas tempranas de diferenciación como en tardías. Esta vía, implica un tráfico vesicular retrógrado de cargos, para que las proteínas transloquen al ERGIC, y en él ya ha sido exhibida la colaboración de Rab18 (Dejgaard and Presley, 2019; Gerondopoulos et al., 2014).

Por último, también se analizó la expresión de la proteína Rab18 en los dos depósitos, TAO y TAS, en pacientes obesos con diferente grado de sensibilidad a insulina (NG, IR y T2D). Estos resultados muestran que la expresión de la proteína Rab18 manifiesta dimorfismo sexual en TAO entre individuos obesos NG, ya que en esta condición los niveles de expresión de Rab18 fueron significativamente diferentes entre ambos sexos, presentando las mujeres un mayor contenido de la GTPasa que los hombres. Además, se encontraron cambios significativos a la baja en la expresión de la GTPasa en el TAO de la condición de IR de la cohorte de mujeres, sugiriendo que Rab18 podría ser un biomarcador potencial en mujeres para determinar el grado de sensibilidad a

insulina de pacientes obesos. De hecho, el dimorfismo sexual en respuesta a insultos metabólicos es bastante común, siendo reportado, por ejemplo, entre las proteínas Rab4 y Rab5 (Bangasser and Valentino, 2012), especialmente en trastornos de la respuesta inmune durante la pubertad.

En resumen, todos los orgánulos intracelulares son altamente dinámicos y su estrecha cooperación es crucial para mantener la homeostasis celular, en muchos casos incluso contactando físicamente entre ellos. Sin embargo, explorar esos sitios de contacto e inferir cambios fisiopatológicos no es fácil. Parece evidente que hay que reconocer que en cualquier patología podrían encontrarse trastornos de los MCSs, por lo que este debe ser el punto de partida para fomentar el desarrollo de técnicas e investigaciones destinadas a caracterizarlos. Éste hecho puede ser particularmente relevante para comprender desórdenes clínicos que actualmente presentan fenotipos poco conocidos, de los que podrían beneficiarse los individuos que los padecen, así como de lograr un diagnóstico más claro. Además, ya hay enfermedades y sintomatologías que se han correlacionado con trastornos de MCSs como el cáncer, la diabetes, el Alzheimer y la enfermedad de Parkinson (Parducho, 2019; Simmen and Tagaya, 2017), todas ellas diagnosticadas por ensayos de inmunofluorescencia. Para su estudio, está siendo interesante el desarrollo de técnicas de imagen que se benefician de la inducción/represión de la motilidad y/o de la proliferación de orgánulos en condiciones patológicas y basales (Ratbi et al., 2015; Wanders et al., 2017), así como de instrumentos suficientemente sensibles para detectar metabolitos específicos que se sintetizan en la célula principalmente como consecuencia de un determinado MCS (Braverman et al., 2013; Castro et al., 2018). Finalmente, conocer marcadores de MCSs, como lo es Rab18 en el contacto RE-GL y RE-peroxisoma de adipocitos obesos, puede ser útil para la clasificación de otros trastornos en los sitios de contacto entre orgánulos.

SEGUNDO ESTUDIO: *Caracterización funcional de Rab34 en adipocitos y regulación de esta GTPasa en respuesta a procesos patológicos asociados a obesidad*

La visión inicial de las GLs como simples orgánulos responsables del almacenamiento de energía ha cambiado notablemente en los últimos años. De esta forma, actualmente se acepta que son orgánulos altamente dinámicos y complejos, involucrados en importantes procesos celulares que necesariamente incluyen el almacenamiento y movilización de TAGs de forma estrictamente regulada (Henne et al., 2018; Reue, 2011). Este cambio de paradigma ha sido respaldado en gran medida por la identificación de proteínas asociadas a la monocapa de las GLs de los adipocitos y otros tipos de células (Guzmán-Ruiz et al., 2020; Hashemi and Goodman, 2015; Yang et al., 2012; Zehmer et al., 2009). Los estudios proteómicos pioneros de GL realizados por Brasaemle et al. revelaron que la estimulación de la lipólisis en adipocitos 3T3-L1 mediante la exposición a agonistas β -adrenérgicos indujo el reclutamiento de proteínas como PLIN2, CAV1 y Rab GTPasas (entre ellas, Rab18) a la superficie de la GL (Brasaemle et al., 2004). Más recientemente, un estudio proteómico de GLs aisladas de adipocitos 3T3-L1 diferenciados nos permitió identificar la presencia de un miembro adicional de la familia Rab, Rab34, asociado con la cubierta de las GLs, tanto en condiciones no estimuladas como estimuladas con insulina (Guzmán-Ruiz et al., 2020). En este trabajo proporcionamos evidencia experimental que respalda un papel regulador para Rab34 en el almacenamiento de lípidos en las GLs mediante la modulación de la disponibilidad en la superficie de las GLs de la chaperona lipídica y regulador de la lipólisis FABP5.

Una característica relevante de Rab34 es que transita del aparato de Golgi a las GLs de manera dependiente de la diferenciación, es decir, cuando las GLs aparecen en los preadipocitos 3T3-L1 (D3 en adelante). Esta característica nos ha permitido desvelar la ruta de tráfico seguida por Rab34 para llegar a las GLs (**Fig. 2C y Fig. 33**). Según nuestros estudios de doble tinción para diferenciar los adipocitos 3T3-L1, esta ruta incluiría el transporte retrógrado de Rab34 desde el aparato de Golgi a los compartimentos relacionados con el RE en las primeras etapas de diferenciación, seguido de la transferencia a las GLs (desde D3 en adelante). Nuestros estudios de microscopía confocal que muestran alta tasa de

colocalización entre Rab34 y ARF1 en etapas tempranas de diferenciación sugieren que la primera fase podría estar mediada a través de la vía de transporte retrógrado COPI. Esto está respaldado por los resultados obtenidos con BFA, un fármaco fúngico que bloquea la formación de vesículas de COPI al evitar la asociación de membrana de ARF1 (Hsu and Yang, 2009). Así, la exposición de las células 3T3-L1 a BFA antes de la formación de GLs (es decir, D2) redujo significativamente la asociación posterior de Rab34 a GLs, lo que respalda una relación entre el transporte retrógrado de Rab34 y el tráfico de COPI.

Cabe destacar que se ha reportado que la mayor parte de COPI está ubicado en el ERGIC y se ha propuesto que este tipo de coatómeros participa en la organización de este compartimento (Martínez-Menárguez et al., 1999; Oprins et al., 1993). Además, se ha propuesto un papel para COPI en la mediación del tráfico de proteínas desde ERGIC a la GL (Soni et al., 2009). Nuestros hallazgos que demuestran un aumento en la colocalización entre Rab34 y ERGIC53 en D3 de diferenciación sugirieron un papel para una ruta de ERGIC a GL implicada en el direccionamiento de Rab34 a la GL, al menos en las primeras etapas de la biogénesis de la GL. En este contexto, la ruta de RE a GL representa una ruta importante para la señalización de proteínas a las GLs (Song et al., 2022). Además, se acepta que las GLs se forman y crecen a partir del RE (Nettebrock and Bohnert, 2020; Pol et al., 2014; Wilfling et al., 2014a). Al brotar, las GLs maduras pueden permanecer conectadas a las membranas del RE a través de puentes de membrana (Nettebrock and Bohnert, 2020; Pol et al., 2014; Wilfling et al., 2014a). De esta forma, las proteínas en la membrana del RE alcanzarían la superficie de la GL por difusión lateral. Curiosamente, estudios recientes en células de *Drosophila* han identificado una vía de transporte tardía de RE a GL que parte de ERES y transporta a la GL a proteínas como GPAT4 y otras enzimas metabolizadoras de lípidos (Song et al., 2022).

De acuerdo con estos hallazgos, observamos que Rab34 colocalizó cada vez más con SEC16A a medida que las GLs maduras se acumulan en el citoplasma de los adipocitos 3T3-L1 en diferenciación, lo que indica que los ERES pueden representar una vía para la entrada de Rab34 a la superficie de las GLs. Esta ruta tardía podría ocurrir a expensas del tránsito de Rab34 a GL a través de

ERGIC, como lo indica la disminución progresiva en la colocalización Rab34-ERGIC53, que es paralela al aumento de colocalización entre Rab34-SEC16A. Estos resultados están de acuerdo con nuestros datos de células humanas primarias que indican una mayor localización de Rab34 en ERES a lo largo del tiempo de diferenciación en adipocitos tanto de TAO como de TAS. A pesar de esto, nuestros resultados de inmunocitoquímica en adipocitos maduros recién aislados y adipocitos diferenciados *in vitro* (TAO y, especialmente, adipocitos de TAS) indican que el ERGIC también podría representar una vía para el transporte tardío de Rab34. En conjunto, estos resultados sugieren la existencia de dos sitios distintos para la transferencia de Rab34 a la GL, ERGIC y ERES, cuya preferencia puede regularse de manera dependiente de la diferenciación de los adipocitos y del depósito de tejido adiposo en que se encuentren. Según nuestros datos actuales en adipocitos cultivados en microgeles 3D que imitan el microambiente fibrótico del TAS en el contexto de la obesidad (Guzmán-Ruiz et al., 2020), es tentador especular que el tráfico de Rab34 a través de ERES y/o ERGIC se interrumpe en estas condiciones. Se necesitan más estudios para establecer completamente las rutas de tráfico de proteínas a las GLs en los adipocitos, así como para revelar si otros insultos asociados con la obesidad pueden regular de manera diferencial la distribución de Rab34 en ERGIC, ERES y GL.

La observación de que Rab34 se localizó en el aparato de Golgi en preadipocitos en la diferenciación temprana y, ocasionalmente, en adipocitos diferenciados (especialmente en adipocitos primarios humanos de TAO), así como cuando se expresó exógenamente, nos llevó a analizar el papel de esta GTPasa en este compartimento. Similar a lo reportado para otras proteínas Rab unidas a las membranas de Golgi (Liu and Storrie, 2015), la proteína Rab34 exógenamente expresada indujo la fragmentación de las cisternas del Golgi, mientras que el silenciamiento de Rab34 no tuvo efecto en la organización de Golgi. Estos resultados indican que Rab34 puede clasificarse como una proteína Rab de Clase 2 asociada a Golgi, a diferencia de las Rabs de Clase 1 (en las que la inactivación de la proteína Rab induce fragmentación de Golgi) (Liu and Storrie, 2015). Estos hallazgos nos llevaron a investigar si Rab34 también puede tener un papel en las funciones del aparato de Golgi en los adipocitos, lo que incluye

la regulación de la clasificación y el tráfico de adiponectina para su secreción (Xie et al., 2008, 2006).

En esta línea, observamos que la expresión de Rab34 aumentó mientras que el silenciamiento de Rab34 disminuyó la secreción de adiponectina, lo que sugiere que, cuando se asocia con el aparato de Golgi, la GTPasa puede participar en el tráfico de adiponectina. Esto sería coherente con el papel que desempeña Rab34 en otros tipos de células en las que esta GTPasa también se encuentra en el aparato de Golgi y regula la liberación de vesículas de transporte desde el TGN a la vía secretora (Goldenberg et al., 2007). Curiosamente, nuestros estudios muestran que la expresión de Rab34 en preadipocitos también aumentó la cantidad de multímeros de adiponectina intracelular, lo que estaría de acuerdo con el papel que desempeña el aparato de Golgi en el ensamblaje de oligómeros de adiponectina de alto peso molecular (Hampe et al., 2015).

En resumen, nuestros resultados sugieren que Rab34, cuando se encuentra en el Golgi, regula tanto la integridad de las cisternas como el tráfico y la oligomerización de adiponectina, lo que sugiere la participación de esta GTPasa en el mantenimiento de la organización y función secretora del Golgi. En concreto, nuestros datos sugieren que las funciones de Rab34 en el aparato de Golgi pueden ser relevantes para los adipocitos en las primeras etapas de diferenciación. Después, a medida que los adipocitos se diferencian, la acción de Rab34 sobre la liberación de adiponectina podría ser reemplazada por otras proteínas que participan en la vía secretora. En esta línea, se ha demostrado que Rab11 y sus efectores aguas abajo, es decir las proteínas pertenecientes a la llamada *Rab11-Family of Interacting Proteins* (FIPs), regulan el tráfico y la secreción de adiponectina desde el compartimento endosomal en adipocitos 3T3-L1 diferenciados (Carson et al., 2013).

Nuestros estudios respaldan la existencia de señales dependientes de la diferenciación que desencadenan la disociación de Rab34 del aparato de Golgi y la reubicación de la GTPasa en la cubierta de la GL. Parece probable que la asociación de Rab34 con cada compartimento esté regulada por interactores específicos cuya expresión y/o disponibilidad en estos sitios puede, a su vez, estar regulada durante la adipogénesis. La evidencia disponible indica que el direccionamiento de Rabs a membranas intracelulares está determinado

principalmente por GEF específicos localizados en la membrana del compartimento donador (Homma et al., 2021; Pylypenko et al., 2017).

En este escenario, la observación del mutante Rab34 inactivo (unido a GDP) (T66N) asociado con las membranas de Golgi indica que la activación de Rab34 por GEF(s) de Golgi no es requisito para unirse a este compartimento. En contraste con el mutante inactivo, el mutante activo (unido a GTP) (Q111L) también se unió a las GLs, lo que respalda una relación entre la activación de Rab34 y la translocación a GLs. En su forma activa en las GLs, Rab34 interactuaría con efectores específicos en este compartimento celular. De acuerdo con nuestros resultados, otros estudios similares sobre la distribución celular de las isoformas de Rab34 (activa e inactiva) en otros tipos de células han demostrado que la localización de Rab34 depende del estado de activación (Kasmapour et al., 2012; Shu et al., 2015; Speight and Silverman, 2005; Wang and Hong, 2002)

Los efectores de Rab GTPasas comprenden una variedad de proteínas o complejos de proteínas que interactúan y transmiten funciones específicas de las Rabs de una manera regulada espaciotemporalmente (Pylypenko et al., 2017). Con respecto a Rab34, se ha demostrado que esta GTPasa interactúa con un efector Rab7 llamado *Rab Interacting Lysosomal Protein* (RILP), para regular la distribución espacial de melanosomas y lisosomas en melanocitos y células NRK, respectivamente (Matsui et al., 2012; Wang and Hong, 2002). Aunque no podemos excluir la posibilidad de que dicha asociación también ocurra en adipocitos, ni los estudios de BioID ni los de inmunoprecipitación identificaron a RILP como una posible proteína de interacción con Rab34 en los adipocitos. De hecho, la asociación de Rab34 con las GLs, junto con la observación de que la expresión de Rab34 aumentaba tanto el tamaño de la GL como el contenido de lípidos intracelulares al tiempo que disminuía la lipólisis, y estos efectos se contrarrestaban con la regulación a la baja de Rab34, sugirió que los efectores que transmiten las acciones de Rab34 sobre la homeostasis de los lípidos en los adipocitos deberían ser también relacionados con las GLs. Curiosamente, ni la expresión de Rab34 ni el silenciamiento modificaron la expresión de enzimas clave que regulan la lipogénesis, lo que sugiere que los cambios inducidos por Rab34 en el contenido de lípidos en las GLs pueden estar

relacionados con la regulación de la hidrólisis de lípidos. En este escenario, los transportadores de ácidos grasos, FABP4 y FABP5, con funciones críticas en la regulación del transporte de lípidos (Hotamisligil and Bernlohr, 2015; Xu et al., 2022) así como la lipólisis a través de su interacción con HSL (Hotamisligil and Bernlohr, 2015; Xu et al., 2022), podrían actuar como efectores de la función de Rab34 en los adipocitos. No obstante, y aunque FABP4 también se asocia con GLs en adipocitos (Guzmán-Ruiz et al., 2020), no encontramos interacción entre esta chaperona y Rab34 en los experimentos de inmunoprecipitación. En línea con nuestros datos microscópicos (Moreno-Castellanos et al., 2017) y proteómicos anteriores (Guzmán-Ruiz et al., 2020), nuestros estudios inmunocitoquímicos actuales demostraron la asociación de FABP5 con la superficie de la GL, en la que colocaliza con Rab34. Además, tanto los estudios de BiOLD como los de inmunoprecipitación identificaron FABP5 como parte del interactoma de Rab34, una observación que fue confirmada por experimentos de co-IP. En conjunto, estos resultados, junto con nuestros hallazgos sobre la modulación de la lipólisis mediante la expresión de Rab34 o FABP5, y el bloqueo de la lipólisis estimulada por FABP5 cuando se expresa conjuntamente con Rab34, respaldaron una relación funcional entre estas dos proteínas. Cabe destacar que, según nuestros datos, esta GTPasa ejercería un efecto inhibitorio sobre la función de FABP5. La observación de que la expresión de Rab34 redujo el contenido de proteína FABP5 (pero no el de ARNm) indicó que esta inhibición podría explicarse por un efecto de la GTPasa en la estabilidad de la proteína FABP5, que estaría mediada por la ubiquitinación inducida por Rab34 y la degradación proteasomal de FABP5. En particular, aunque la expresión de Rab34 también redujo el contenido de proteína de la lipasa asociada a GL, ATGL, pudiendo contribuir al efecto neto de la GTPasa en la acumulación de lípidos, este efecto no fue impedido por MG132 y tampoco se pudo demostrar una interacción directa entre estas dos proteínas. Asimismo, no se detectó una interacción directa entre Rab34 y HSL en nuestros estudios de inmunoprecipitación. De acuerdo con nuestros estudios, es razonable proponer que UBA1 actúa como el efector de Rab34, transmitiendo la acción de la GTPasa sobre FABP5 y, por lo tanto, regulando la lipólisis y la acumulación de lípidos en los adipocitos (**Fig. 52**).

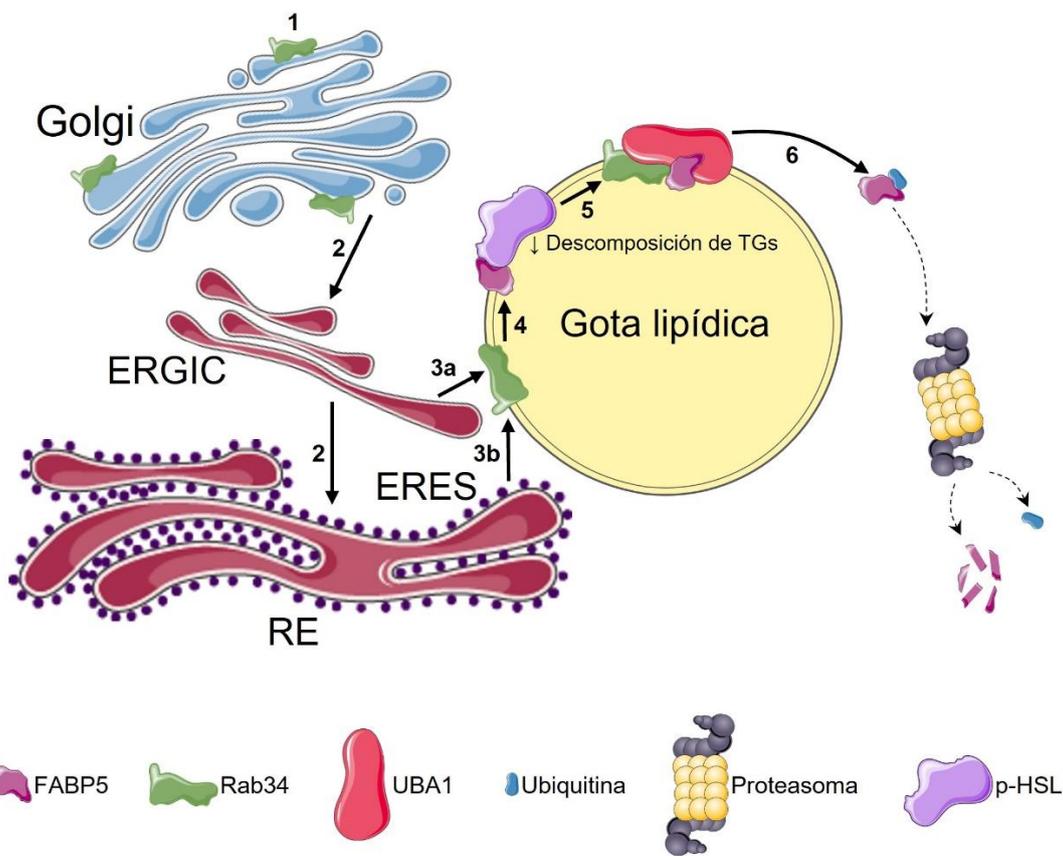


Figure 52. Representación esquemática de la ruta de tráfico y mecanismos de acción propuestos para Rab34 en adipocitos. Rab34 se encuentra en el aparato de Golgi en preadipocitos (1) y se transfiere a la superficie de la GL tras la biogénesis de GL. Específicamente, Rab34 se transporta desde el Golgi a los compartimentos relacionados con RE a través de la vía de transporte retrógrado mediada por COPI (2) y se dirige a la superficie de la GL a través de ERGIC (3a) y/o ERES (3b). Una vez alcanza la GL, Rab34 podría unirse a FABP5 (4) y reclutar a UBA1 (5), lo que promovería la ubiquitinación y la degradación proteasomal de FABP5 (6). La eliminación de FABP5 de las GLs evitaría la activación completa de HSL fosforilada (p-HSL), lo que reduciría la lipólisis y, en última instancia, daría como resultado una mayor acumulación de lípidos en las GLs. La figura se generó parcialmente utilizando Servier Medical Art, proporcionado por Servier, con licencia Creative Commons Attribution 3.0.

Hasta la fecha, este es el primer estudio que informa un papel potencial de una proteína Rab en la regulación de la ubiquitinación y degradación de proteínas. En el caso de Rab34, esta noción se ve reforzada por nuestros estudios que demuestran que esta GTPasa interactúa no solo con UBA1 sino también con otras proteínas de GL relacionadas con el sistema de ubiquitina (UCHL3 e

ISG15). Queda por investigar si la acción de Rab34-UBA1 se ejerce exclusivamente en las GLs u otras ubicaciones celulares ocupadas por la GTPasa (principalmente el aparato de Golgi). En esta línea, los efectores de Rab son regulados espacial y temporalmente (Wandinger-Ness and Zerial, 2014) y por tanto, parece plausible que la composición proteica del interactoma Rab34 varíe dependiendo del compartimento celular.

Conclusiones

CONCLUSIONES

PRIMER ESTUDIO: *Análisis de los sitios de contacto inter-orgánulos en adipocitos normales y disfuncionales usando la pequeña GTPasa, Rab18, como un modelo molecular*

1. La inducción de fibrosis, como ocurre en el tejido adiposo en obesidad, provocó la fragmentación del RE y el aumento de los contactos RE-GL y RE-peroxisoma, lo que probablemente afecta a la biogénesis de la GL y a las funciones peroxisomales.
2. La exposición a hiperglucemia/hiperinsulinemia o a condiciones inflamatorias mejoró los sitios de contacto RE-GL pero indujo la acumulación de Rab18 en dominios ER específicos de los adipocitos, lo que indica un tráfico deficiente de esta proteína hacia las GL, con los consiguientes efectos negativos sobre el recambio lipídico en las GLs.
3. Los contactos entre el RE y los peroxisomas también aumentaron tras la exposición a hiperglucemia/hiperinsulinemia o a condiciones inflamatorias, y Rab18 permaneció en estos sitios de contacto, lo que puede tener un impacto en las funciones de biosíntesis oxidativa/lipídica de los peroxisomas.

SEGUNDO ESTUDIO: *Caracterización funcional de Rab34 en adipocitos y regulación de esta GTPasa en respuesta a procesos patológicos asociados a obesidad*

1. A través de su asociación diferencial con el aparato de Golgi y las GLs, Rab34 puede actuar como un regulador polivalente de la funcionalidad de los adipocitos, dependiente de la diferenciación.
2. El tráfico de proteínas como Rab34 desde el Golgi hasta la superficie de las GLs puede producirse a través de una vía retrógrada en la que intervienen ERGIC y ERES.
3. Cuando se localiza en la vía secretora (aparato de Golgi y/o el RE) Rab34 regula la actividad biológica (es decir, la oligomerización) y la secreción de una importante adipoquina con acciones sensibilizadoras a la insulina, la adiponectina.
4. Rab34 en las GLs interactúa con y promueve la destrucción de FABP5 mediada por UBA1 a través del sistema proteasoma, regulando así la lipólisis y acumulación de TAG.

5. La desregulación de la expresión y/o el tráfico de Rab34 en la obesidad puede contribuir a la alteración de la secreción de adipocinas y del metabolismo lipídico que caracterizan la disfunción de los adipocitos, en condiciones de exceso de adiposidad.

Conclusions

CONCLUSIONS

FIRST STUDY: *Analysis of inter-organelle contact sites in normal and dysfunctional adipocytes using the small GTPase, Rab18, as a molecular model*

1. Induction of fibrosis, as occurs in the adipose tissue in obesity, caused ER fragmentation and increased ER-LD and ER-peroxisome contacts, which likely affects LD biogenesis and peroxisome functions.
2. Exposure to either hyperglycemia/hyperinsulinemia or inflammatory conditions enhanced ER-LD contact sites but induced Rab18 accumulation at specific ER domains in adipocytes, indicating an impaired traffic of this protein to LDs, with the resulting negative effects on lipid turnover at the LDs.
3. Contacts between ER and peroxisomes were also increased after exposure to either hyperglycemia/hyperinsulinemia or inflammatory conditions, with Rab18 remaining at these contact sites, which may have an impact on the oxidative/lipid biosynthesis roles of peroxisomes.

SECOND STUDY: *Functional characterization of Rab34 in adipocytes and regulation of this GTPase in response to obesity-associated pathogenic processes*

1. Through its differential association with the Golgi apparatus and the LDs, Rab34 may act as a multipurpose, differentiation-dependent regulator of adipocyte functionality.
2. Trafficking of proteins such as Rab34 from the Golgi to the lipid droplet surface may occur through a retrograde pathway involving the ERGIC and ERES.
3. When located at the secretory pathway (Golgi apparatus and/or the ER) Rab34 regulates the biological activity (i.e., oligomerization) and secretion of a major adipokine with insulin-sensitizing actions, adiponectin.
4. Rab34 at the LDs interacts with and promotes UBA1-mediated FABP5 destruction by the proteasome system, thus regulating TAG lipolysis and accumulation.
5. Dysregulation of Rab34 expression and/or traffic in obesity may contribute to the altered adipokine secretion and lipid metabolism that characterize adipocyte dysfunction, in conditions of excess adiposity.

Referencias

REFERENCIAS

- 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. doi:10.1016/J.EURURO.2015.09.019
- Abdullahi A, Stanojic M, Parousis A, Patsouris D, Jeschke MG. 2017. MODELING ACUTE ER STRESS in VIVO and in VITRO. *Shock* **47**:506–513. doi:10.1097/SHK.0000000000000759
- Ahima RS. 2006. Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity (Silver Spring)* **14 Suppl 5**. doi:10.1038/OBY.2006.317
- Alcalá M, Calderon-Dominguez M, Bustos E, Ramos P, Casals N, Serra D, Viana M, Herrero L. 2017. Increased inflammation, oxidative stress and mitochondrial respiration in brown adipose tissue from obese mice. *Sci Rep* **7**. doi:10.1038/S41598-017-16463-6
- Ali BR, Wasmeier C, Lamoreux L, Strom M, Seabra MC. 2004. Multiple regions contribute to membrane targeting of Rab GTPases. *J Cell Sci* **117**:6401–6412. doi:10.1242/JCS.01542
- Angers CG, Merz AJ. 2011. New links between vesicle coats and Rab-mediated vesicle targeting. *Semin Cell Dev Biol* **22**:18–26. doi:10.1016/J.SEMCDB.2010.07.003
- Bangasser DA, Valentino RJ. 2012. Sex differences in molecular and cellular substrates of stress. *Cell Mol Neurobiol* **32**:709–723. doi:10.1007/S10571-012-9824-4
- Banworth MJ, Li G. 2018. Consequences of Rab GTPase dysfunction in genetic or acquired human diseases. *Small GTPases* **9**:158–181. doi:10.1080/21541248.2017.1397833
- Barazzoni R, Gortan Cappellari G, Ragni M, Nisoli E. 2018. Insulin resistance in obesity: an overview of fundamental alterations. *Eat Weight Disord* **23**:149–157. doi:10.1007/S40519-018-0481-6/FIGURES/2
- Barbosa AD, Sembongi H, Su WM, Abreu S, Reggiori F, Carman GM, Siniouoglou S. 2015. Lipid partitioning at the nuclear envelope controls membrane biogenesis. *Mol Biol Cell* **26**:3641–3657. doi:10.1091/MBC.E15-

03-0173

- Barbosa AD, Siniosoglou S. 2017. Function of lipid droplet-organelle interactions in lipid homeostasis. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* **1864**:1459–1468. doi:10.1016/J.BBAMCR.2017.04.001
- Beilstein F, Bouchoux J, Rousset M, Demignot S. 2013. Proteomic Analysis of Lipid Droplets from Caco-2/TC7 Enterocytes Identifies Novel Modulators of Lipid Secretion. *PLoS One* **8**:e53017. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0053017
- Bersuker K, Olzmann JA. 2017. Establishing the lipid droplet proteome: Mechanisms of lipid droplet protein targeting and degradation. *Biochim Biophys acta Mol cell Biol lipids* **1862**:1166–1177. doi:10.1016/J.BBALIP.2017.06.006
- Bloor ID, Symonds ME. 2014. Sexual dimorphism in white and brown adipose tissue with obesity and inflammation. *Horm Behav* **66**:95–103. doi:10.1016/J.YHBEH.2014.02.007
- Bosch M, Sánchez-Álvarez M, Fajardo A, Kapetanovic R, Steiner B, Dutra F, Moreira L, López JA, Campo R, Marí M, Morales-Paytuví F, Tort O, Gubern A, Templin RM, Curson JEB, Martel N, Català C, Lozano F, Tebar F, Enrich C, Vázquez J, Del Pozo MA, Sweet MJ, Bozza PT, Gross SP, Parton RG, Pol A. 2020. Mammalian lipid droplets are innate immune hubs integrating cell metabolism and host defense. *Science (80-)* **370**. doi:10.1126/SCIENCE.AAY8085/SUPPL_FILE/AAY8085-BOSCH_REPRODUCIBILITY-CHECKLIST.PDF
- Bourgeois C, Gorwood J, Barrail-Tran A, Lagathu C, Capeau J, Desjardins D, Le Grand R, Damouche A, Béréziat V, Lambotte O. 2019. Specific Biological Features of Adipose Tissue, and Their Impact on HIV Persistence. *Front Microbiol* **10**. doi:10.3389/FMICB.2019.02837
- Brasaemle DL, Dolios G, Shapiro L, 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. doi:10.1074/JBC.M409340200
- Braverman NE, D'Agostino MD, MacLean GE. 2013. Peroxisome biogenesis disorders: Biological, clinical and pathophysiological perspectives. *Dev Disabil Res Rev* **17**:187–196. doi:10.1002/DDRR.1113

- Braverman NE, Moser AB. 2012. Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochim Biophys Acta* **1822**:1442–1452. doi:10.1016/J.BBADIS.2012.05.008
- Cai H, Reinisch K, Ferro-Novick S. 2007. Coats, Tethers, Rabs, and SNAREs Work Together to Mediate the Intracellular Destination of a Transport Vesicle. *Dev Cell* **12**:671–682. doi:10.1016/J.DEVCEL.2007.04.005
- Carmen GY, Víctor SM. 2006. Signalling mechanisms regulating lipolysis. *Cell Signal* **18**:401–408. doi:10.1016/J.CELLSIG.2005.08.009
- Carson BP, Del Bas JM, Moreno-Navarrete JM, Fernandez-Real JM, Mora S. 2013. The rab11 effector protein FIP1 regulates adiponectin trafficking and secretion. *PLoS One* **8**. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0074687
- Castro IG, Schuldiner M, Zalckvar E. 2018. Mind the Organelle Gap – Peroxisome Contact Sites in Disease. *Trends Biochem Sci* **43**:199–210. doi:10.1016/j.tibs.2018.01.001
- Cedikova M, Kripnerová M, Dvorakova J, Pitule P, Grundmanova M, Babuska V, Mullerova D, Kuncova J. 2016. Mitochondria in White, Brown, and Beige Adipocytes. *Stem Cells Int* **2016**. doi:10.1155/2016/6067349
- Chait A, den Hartigh LJ. 2020. Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease. *Front Cardiovasc Med* **7**. doi:10.3389/FCVM.2020.00022
- Christodoulides C, Lagathu C, Sethi JK, Vidal-Puig A. 2009. Adipogenesis and WNT signalling. *Trends Endocrinol Metab* **20**:16–24. doi:10.1016/J.TEM.2008.09.002
- Christoforidis S, McBride HM, Burgoyne RD, Zerial M. 1999a. The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature* **397**:621–625. doi:10.1038/17618
- Christoforidis S, Miaczynska M, Ashman K, Wilm M, Zhao L, Yip SC, Waterfield MD, Backer JM, Zerial M. 1999b. Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors. *Nat Cell Biol* **1**:249–252. doi:10.1038/12075
- Cinti S. 2019. Anatomy and physiology of the nutritional system. *Mol Aspects Med* **68**:101–107. doi:10.1016/J.MAM.2019.04.001
- Cohen S, Valm AM, Lippincott-Schwartz J. 2018. Interacting organelles. *Curr Opin Cell Biol* **53**:84–91. doi:10.1016/J.CEB.2018.06.003
- Costello JL, Castro IG, Hacker C, Schrader TA, Metz J, Zeuschner D, Azadi AS,

- Godinho LF, Costina V, Findeisen P, Manner A, Islinger M, Schrader M. 2017. ACBD5 and VAPB mediate membrane associations between peroxisomes and the ER. *J Cell Biol* **216**:331–342. doi:10.1083/JCB.201607055
- Cristancho AG, Lazar MA. 2011. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**:722–734. doi:10.1038/NRM3198
- Crujeiras AB, Carreira MC, Cobia B, Andrade S, Amil M, Casanueva FF. 2015. Leptin resistance in obesity: An epigenetic landscape. *Life Sci* **140**:57–63. doi:10.1016/J.LFS.2015.05.003
- Czech MP, Tencerova M, Pedersen DJ, Aouadi M. 2013. Insulin signalling mechanisms for triacylglycerol storage. *Diabetologia*. doi:10.1007/s00125-013-2869-1
- Dejgaard SY, Murshid A, Erman A, Kizilay Ö, Verbich D, Lodge R, Dejgaard K, Ly-Hartig TBN, Pepperkok R, Simpson JC, Presley JF. 2008. Rab18 and Rab43 have key roles in ER-Golgi trafficking. *J Cell Sci* **121**:2768–2781. doi:10.1242/JCS.021808
- Dejgaard SY, Presley JF. 2019. Rab18: new insights into the function of an essential protein. *Cell Mol Life Sci* **76**:1935–1945. doi:10.1007/S00018-019-03050-3/TABLES/1
- Demichev V, Messner CB, Vernardis SI, Lilley KS, Ralser M. 2020. DIA-NN: neural networks and interference correction enable deep proteome coverage in high throughput. *Nat Methods* **17**:41–44. doi:10.1038/S41592-019-0638-X
- Demine S, Tejerina S, Bihin B, Thiry M, Reddy N, Renard P, Raes M, Jadot M, Arnould T. 2018. Mild mitochondrial uncoupling induces HSL/ATGL-independent lipolysis relying on a form of autophagy in 3T3-L1 adipocytes. *J Cell Physiol* **233**:1247–1265. doi:10.1002/JCP.25994
- Di Jeso B, Pereira R, Consiglio E, Formisano S, Satrustegui J, Sandoval I V. 1998. Demonstration of a Ca²⁺ requirement for thyroglobulin dimerization and export to the golgi complex. *Eur J Biochem* **252**:583–590. doi:10.1046/J.1432-1327.1998.2520583.X
- Di Jeso B, Ulianich L, Pacifico F, Leonardi A, Vito P, Consiglio E, Formisano S, Arvan P. 2003. Folding of thyroglobulin in the calnexin/calreticulin pathway

- and its alteration by loss of Ca²⁺ from the endoplasmic reticulum. *Biochem J* **370**:449–458. doi:10.1042/BJ20021257
- Díaz-Ruiz A, Guzmán-Ruiz R, Moreno NR, García-Rios A, Delgado-Casado N, Membrives A, Túnez I, El Bekay R, Fernández-Real JM, Tovar S, Diéguez C, Tinahones FJ, Vázquez-Martínez R, López-Miranda J, Malagón MM. 2015. Proteasome Dysfunction Associated to Oxidative Stress and Proteotoxicity in Adipocytes Compromises Insulin Sensitivity in Human Obesity. *Antioxid Redox Signal* **23**:597–612. doi:10.1089/ars.2014.5939
- Ducharme NA, Bickel PE. 2008. Lipid droplets in lipogenesis and lipolysis. *Endocrinology* **149**:942–9. doi:10.1210/en.2007-1713
- Duncan RE, Ahmadian M, Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Sul HS. 2007. Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annu Rev Nutr* **27**:79–101. doi:10.1146/ANNUREV.NUTR.27.061406.093734
- Echard A, Jollivet F, Martinez O, Lacapère JJ, Rousselet A, Janoueix-Lerosey I, Goud B. 1998. Interaction of a Golgi-associated kinesin-like protein with Rab6. *Science* **279**:580–585. doi:10.1126/SCIENCE.279.5350.580
- Esteve Ràfols M. 2014. Adipose tissue: cell heterogeneity and functional diversity. *Endocrinol Nutr* **61**:100–112. doi:10.1016/J.ENDONU.2013.03.011
- Fagerberg L, Hallstrom BM, Oksvold P, Kampf C, Djureinovic D, Odeberg J, Habuka M, Tahmasebpoor S, Danielsson A, Edlund K, Asplund A, Sjostedt E, Lundberg E, Szigartyo CAK, Skogs M, Ottosson Takanen J, Berling H, Tegel H, Mulder J, Nilsson P, Schwenk JM, Lindskog C, Danielsson F, Mardinoglu A, Sivertsson A, Von Feilitzen K, Forsberg M, Zwahlen M, Olsson I, Navani S, Huss M, Nielsen J, Ponten F, Uhlen M. 2014. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol Cell Proteomics* **13**:397–406. doi:10.1074/MCP.M113.035600
- Fernandes-da-Silva A, Miranda CS, Santana-Oliveira DA, Oliveira-Cordeiro B, Rangel-Azevedo C, Silva-Veiga FM, Martins FF, Souza-Mello V. 2021. Endoplasmic reticulum stress as the basis of obesity and metabolic diseases: focus on adipose tissue, liver, and pancreas. *Eur J Nutr* **2021** 606 **60**:2949–2960. doi:10.1007/S00394-021-02542-Y
- Frayn K. 2002. Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. *Diabetologia* **45**:1201–1210. doi:10.1007/S00125-002-0873-Y/METRICS

- Frayn KN, Karpe F, Fielding BA, Macdonald IA, Coppack SW. 2003. Integrative physiology of human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord* **27**:875–888. doi:10.1038/SJ.IJO.0802326
- Freedland ES. 2004. Role of a critical visceral adipose tissue threshold (CVATT) in metabolic syndrome: implications for controlling dietary carbohydrates: a review. *Nutr Metab 2004 11* **1**:1–24. doi:10.1186/1743-7075-1-12
- Frigolet ME, Gutiérrez-Aguilar R. 2020. The colors of adipose tissue. *Gac Med Mex* **156**:142–149. doi:10.24875/GMM.M20000356
- Frühbeck G, Méndez-Giménez L, Fernández-Formoso JA, Fernández S, Rodríguez A. 2014. Regulation of adipocyte lipolysis. *Nutr Res Rev* **27**:63–93. doi:10.1017/S095442241400002X
- Gao M, Huang X, Song BL, Yang H. 2019. The biogenesis of lipid droplets: Lipids take center stage. *Prog Lipid Res* **75**. doi:10.1016/J.PLIPRES.2019.100989
- Geer EB, Shen W. 2009. Gender differences in insulin resistance, body composition, and energy balance. *Gend Med* **6 Suppl 1**:60–75. doi:10.1016/J.GENM.2009.02.002
- Gerondopoulos A, Bastos RN, Yoshimura SI, Anderson R, Carpanini S, Aligianis I, Handley MT, Barr FA. 2014. Rab18 and a Rab18 GEF complex are required for normal ER structure. *J Cell Biol* **205**:707–720. doi:10.1083/JCB.201403026
- Ghaben AL, Scherer PE. 2019. Adipogenesis and metabolic health. *Nat Rev Mol Cell Biol* **20**:242–258. doi:10.1038/S41580-018-0093-Z
- Gimble JM, Bunnell BA, Chiu ES, Guilak F. 2011. Concise Review: Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction Cells and Stem Cells: Let's Not Get Lost in Translation. *Stem Cells* **29**:749–754. doi:10.1002/STEM.629
- Goldenberg NM, Grinstein S, Silverman M. 2007. Golgi-bound Rab34 is a novel member of the secretory pathway. *Mol Biol Cell* **18**:4762–4771. doi:10.1091/MBC.E06-11-0991
- Gomes AQ, Ali BR, Ramalho JS, Godfrey RF, Barral DC, Hume AN, Seabra MC. 2003. Membrane targeting of Rab GTPases is influenced by the prenylation motif. *Mol Biol Cell* **14**:1882–1899. doi:10.1091/MBC.E02-10-0639
- Gómez R, Conde J, Gómez Reino JJ, Lago F, Gualillo O. 2009. Las adipocinas: mediadores emergentes de la respuesta inmune y de la inflamación. *Reumatol Clínica* **5**:6–12. doi:10.1016/J.REUMA.2008.12.003

- González-Ortiz CL, Leguizamón SBJ, Contreras-García GA. 2017. Enfermedad peroxisomal, condrodisplasia rizomelica punctata tipo 1: reporte de caso. *Rev chil pediatr* **88**:511–516. doi:10.4067/S0370-41062017000400011
- Goody RS, Müller MP, Wu YW. 2017. Mechanisms of action of Rab proteins, key regulators of intracellular vesicular transport. *Biol Chem* **398**:565–575. doi:10.1515/HSZ-2016-0274/ASSET/GRAPHIC/J_HSZ-2016-0274_CV_003.JPG
- Goossens GH, Blaak EE. 2015. Adipose tissue dysfunction and impaired metabolic health in human obesity: a matter of oxygen? *Front Endocrinol (Lausanne)* **6**. doi:10.3389/FENDO.2015.00055
- Groen EJM, Gillingwater TH. 2015. UBA1: At the Crossroads of Ubiquitin Homeostasis and Neurodegeneration. *Trends Mol Med* **21**:622–632. doi:10.1016/J.MOLMED.2015.08.003
- Gronemeyer T, Wiese S, Grinhagens S, Schollenberger L, Satyagraha A, Huber LA, Meyer HE, Warscheid B, Just WW. 2013. Localization of Rab proteins to peroxisomes: A proteomics and immunofluorescence study. *FEBS Lett* **587**:328–338. doi:10.1016/J.FEBSLET.2012.12.025
- Gross D, Silver D. 2014. Cytosolic lipid droplets: from mechanisms of fat storage to disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **49**:304–26.
- Guglielmi V, Sbraccia P. 2018. Obesity phenotypes: depot-differences in adipose tissue and their clinical implications. *Eat Weight Disord* **23**:3–14. doi:10.1007/S40519-017-0467-9
- Guilherme A, Virbasius J V., Puri V, Czech MP. 2008. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. doi:10.1038/nrm2391
- Gutierrez 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**:2651–2663. doi:10.4049/JIMMUNOL.181.4.2651
- Guzmán-Ruiz R, Tercero-Alcázar C, Rabanal-Ruiz Y, Díaz-Ruiz A, El Bekay R, Rangel-Zuñiga OA, Navarro-Ruiz MC, Molero L, Membrives A, Ruiz-Rabelo JF, Pandit A, López-Miranda J, Tinahones FJ, Malagón MM. 2020. Adipose tissue depot-specific intracellular and extracellular cues contributing to insulin resistance in obese individuals. *FASEB J*. doi:10.1096/fj.201902703R

- Haczeyni F, Bell-Anderson KS, Farrell GC. 2018. Causes and mechanisms of adipocyte enlargement and adipose expansion. *Obes Rev* **19**:406–420. doi:10.1111/OBR.12646
- Hadj Ahmed S, Koubaa N, Kharroubi W, Zarrouk A, Mnari A, Batbout F, Gamra H, Hammami S, Lizard G, Hammami M. 2017. Identification of long and very long chain fatty acids, plasmalogen-C16:0 and phytanic acid as new lipid biomarkers in Tunisian coronary artery disease patients. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **131**:49–58. doi:10.1016/J.PROSTAGLANDINS.2017.08.001
- Hammer JA, Wu XS. 2002. Rabs grab motors: defining the connections between Rab GTPases and motor proteins. *Curr Opin Cell Biol* **14**:69–75. doi:10.1016/S0955-0674(01)00296-4
- Hampe L, Radjainia M, Xu C, Harris PWR, Bashiri G, Goldstone DC, Brimble MA, Wang Y, Mitra AK. 2015. Regulation and Quality Control of Adiponectin Assembly by Endoplasmic Reticulum Chaperone ERp44. *J Biol Chem* **290**:18111–18123. doi:10.1074/JBC.M115.663088
- Harris CA, Haas JT, Streeper RS, Stone SJ, Kumari M, Yang K, Han X, Brownell N, Gross RW, Zechner R, Farese R V. 2011. DGAT enzymes are required for triacylglycerol synthesis and lipid droplets in adipocytes. *J Lipid Res* **52**:657–667. doi:10.1194/JLR.M013003
- Hashemi HF, Goodman JM. 2015. The life cycle of lipid droplets. *Curr Opin Cell Biol* **33**:119–124. doi:10.1016/J.CEB.2015.02.002
- Heid H, Rickelt S, Zimbelmann R, Winter S, Schumacher H, Dörflinger Y, Kuhn C, Franke WW. 2014. On the formation of lipid droplets in human adipocytes: the organization of the perilipin-vimentin cortex. *PLoS One* **9**. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0090386
- Henne M, Goodman JM, Hariri H. 2020. Spatial compartmentalization of lipid droplet biogenesis. *Biochim Biophys Acta Mol cell Biol lipids* **1865**. doi:10.1016/J.BBALIP.2019.07.008
- Henne WM, Reese ML, Goodman JM. 2018. The assembly of lipid droplets and their roles in challenged cells. *EMBO J* **37**. doi:10.15252/EMBJ.201898947
- Hettema EH, Erdmann R, van der Klei I, Veenhuis M. 2014. Evolving models for peroxisome biogenesis. *Curr Opin Cell Biol* **29**:25–30. doi:10.1016/j.ceb.2014.02.002

- Hill JH, Solt C, Foster MT. 2018. Obesity associated disease risk: The role of inherent differences and location of adipose depots. *Horm Mol Biol Clin Investig* **33**. doi:10.1515/HMBCI-2018-0012/XML
- Homma Y, Hiragi S, Fukuda M. 2021. Rab family of small GTPases: an updated view on their regulation and functions. *FEBS J* **288**:36–55. doi:10.1111/FEBS.15453
- Hotamisligil GS, Bernlohr DA. 2015. Metabolic functions of FABPs--mechanisms and therapeutic implications. *Nat Rev Endocrinol* **11**:592–605. doi:10.1038/NRENDO.2015.122
- Howarth DL, Vacaru AM, Tsedensodnom O, Mormone E, Nieto N, Costantini LM, Snapp EL, Sadler KC. 2012. Alcohol disrupts endoplasmic reticulum function and protein secretion in hepatocytes. *Alcohol Clin Exp Res* **36**:14–23. doi:10.1111/J.1530-0277.2011.01602.X
- Hsu VW, Yang JS. 2009. Mechanisms of COPI vesicle formation. *FEBS Lett* **583**:3758–3763. doi:10.1016/J.FEBSLET.2009.10.056
- Hume AN, Collinson LM, Rapak A, Gomes AQ, Hopkins CR, Seabra MC. 2001. Rab27a regulates the peripheral distribution of melanosomes in melanocytes. *J Cell Biol* **152**:795–808. doi:10.1083/JCB.152.4.795
- Ingelmo-Torres M, González-Moreno E, Kassan A, Hanzal-Bayer M, Tebar F, Herms A, Grewal T, Hancock JF, Enrich C, Bosch M, Gross SP, Parton RG, Pol A. 2009. Hydrophobic and Basic Domains Target Proteins to Lipid Droplets. *Traffic* **10**:1785. doi:10.1111/J.1600-0854.2009.00994.X
- Jacquier N, Choudhary V, Mari M, Toulmay A, Reggiori F, Schneiter R. 2011. Lipid droplets are functionally connected to the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* **124**:2424–2437. doi:10.1242/JCS.076836
- Jayson CBK, Arlt H, Fischer AW, Weng Lai Z, Farese R V., Walther TC. 2018. Rab18 is not necessary for lipid droplet biogenesis or turnover in human mammary carcinoma cells. *Mol Biol Cell* **29**:2045–2054. doi:10.1091/MBC.E18-05-0282
- Jean S, Kiger AA. 2012. Coordination between RAB GTPase and phosphoinositide regulation and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**:463–470. doi:10.1038/nrm3379
- Jenkins-Kruchten AE, Bennaars-Eiden A, Ross JR, Shen WJ, Kraemer FB,

- Bernlohr DA. 2003. Fatty acid-binding protein-hormone-sensitive lipase interaction. Fatty acid dependence on binding. *J Biol Chem* **278**:47636–47643. doi:10.1074/JBC.M307680200
- John BJ, Irukulla S, Abulafi AM, Kumar D, Mendall MA. 2006. Systematic review: adipose tissue, obesity and gastrointestinal diseases. *Aliment Pharmacol Ther* **23**:1511–1523. doi:10.1111/J.1365-2036.2006.02915.X
- Just WW, Peränen J. 2016. Small GTPases in peroxisome dynamics. *Biochim Biophys Acta* **1863**:1006–1013. doi:10.1016/J.BBAMCR.2016.01.004
- Ka FL, Baron R, Ali BR, Magee AI, Seabra MC. 2007. Rab GTPases containing a CAAX motif are processed post-geranylgeranylation by proteolysis and methylation. *J Biol Chem* **282**:1487–1497. doi:10.1074/JBC.M605557200
- Kahn BB, Flier JS. 2000. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* **106**:473–481. doi:10.1172/JCI10842
- Kahn CR, Wang G, Lee KY. 2019. Altered adipose tissue and adipocyte function in the pathogenesis of metabolic syndrome. *J Clin Invest* **129**:3990–4000. doi:10.1172/JCI129187
- Karahuseyinoglu S, Kocafe C, Balci D, Erdemli E, Can A. 2008. Functional structure of adipocytes differentiated from human umbilical cord stroma-derived stem cells. *Stem Cells* **26**:682–691. doi:10.1634/STEMCELLS.2007-0738
- Kasmapour B, Gronow A, Bleck CKE, Hong W, Gutierrez MG. 2012. Size-dependent mechanism of cargo sorting during lysosome-phagosome fusion is controlled by Rab34. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**:20485–20490. doi:10.1073/PNAS.1206811109/-/DCSUPPLEMENTAL/SM04.MOV
- Kawasaki N, Asada R, Saito A, Kanemoto S, Imaizumi K. 2012. Obesity-induced endoplasmic reticulum stress causes chronic inflammation in adipose tissue. *Sci Rep* **2**. doi:10.1038/SREP00799
- Kersten S. 2014. Physiological regulation of lipoprotein lipase. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* **1841**:919–933. doi:10.1016/J.BBALIP.2014.03.013
- Khaminets A, Heinrich T, Mari M, Grumati P, Huebner AK, Akutsu M, Liebmann L, Stolz A, Nietzsche S, Koch N, Mauthe M, Katona I, Qualmann B, Weis J, Reggiori F, Kurth I, Hübner CA, Dikic I. 2015. Regulation of endoplasmic reticulum turnover by selective autophagy. *Nature* **522**:354–358.

doi:10.1038/NATURE14498

- Kim JI, Park J, Ji Y, Jo K, Han SM, Sohn JH, Shin KC, Han JS, Jeon YG, Nahmgoong H, Han KH, Kim J, Kim S, Choe SS, Kim JB. 2019. During Adipocyte Remodeling, Lipid Droplet Configurations Regulate Insulin Sensitivity through F-Actin and G-Actin Reorganization. *Mol Cell Biol* **39**. doi:10.1128/MCB.00210-19
- Kimmel AR, 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. doi:10.1146/annurev-nutr-071813-105410
- Kiss RS, Nilsson T. 2014. Rab proteins implicated in lipid storage and mobilization. *J Biomed Res* **28**:169–177. doi:10.7555/JBR.28.20140029
- Kory N, Farese R V., Walther TC. 2016. Targeting Fat: Mechanisms of Protein Localization to Lipid Droplets. *Trends Cell Biol*. doi:10.1016/j.tcb.2016.02.007
- Kory N, Thiam AR, Farese R V., Walther TC. 2015. Protein Crowding Is a Determinant of Lipid Droplet Protein Composition. *Dev Cell* **34**:351. doi:10.1016/J.DEVCEL.2015.06.007
- Krahmer N, Farese R V., Walther TC. 2013. Balancing the fat: lipid droplets and human disease. *EMBO Mol Med* **5**:973–983. doi:10.1002/EMMM.201100671
- Kucharz K, Wieloch T, Toresson H. 2011. Rapid fragmentation of the endoplasmic reticulum in cortical neurons of the mouse brain in situ following cardiac arrest. *J Cereb Blood Flow Metab* **31**:1663–1667. doi:10.1038/JCBFM.2011.37
- Kuerschner L, Moessinger C, Thiele C. 2008. Imaging of lipid biosynthesis: how a neutral lipid enters lipid droplets. *Traffic* **9**:338–352. doi:10.1111/J.1600-0854.2007.00689.X
- Ladeira MM, Schoonmaker JP, Gionbelli MP, Dias JCO, Gionbelli TRS, Carvalho JRR, Teixeira PD. 2016. Nutrigenomics and Beef Quality: A Review about Lipogenesis. *Int J Mol Sci* 2016, Vol 17, Page 918 **17**:918. doi:10.3390/IJMS17060918
- Lampidonis AD, Rogdakis E, Voutsinas GE, Stravopodis DJ. 2011. The resurgence of Hormone-Sensitive Lipase (HSL) in mammalian lipolysis.

- Gene* **477**:1–11. doi:10.1016/J.GENE.2011.01.007
- Landstrom AP, Beavers DL, Wehrens XHT. 2014. The junctophilin family of proteins: from bench to bedside. *Trends Mol Med* **20**:353–362. doi:10.1016/J.MOLMED.2014.02.004
- Lara-Chica M, Correa-Sáez A, Jiménez-Izquierdo R, Garrido-Rodríguez M, Ponce FJ, Moreno R, Morrison K, Di Vona C, Arató K, Jiménez-Jiménez C, Morrugares R, Schmitz ML, de la Luna S, de la Vega L, Calzado MA. 2022. A novel CDC25A/DYRK2 regulatory switch modulates cell cycle and survival. *Cell Death Differ* **29**:105–117. doi:10.1038/S41418-021-00845-5
- Laura P, Sandra LG, Jérôme G, Franck C, François P, Alexandre B, Jean-François T, Mireille C. 2013. Rab4b controls an early endosome sorting event by interacting with the γ -subunit of the clathrin adaptor complex 1. *J Cell Sci* **126**:4950–4962. doi:10.1242/JCS.130575
- Lauterbach MAR, Wunderlich FT. 2017. Macrophage function in obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* **2017** **4693** **469**:385–396. doi:10.1007/S00424-017-1955-5
- Lee S, Zhang C, Kilicarslan M, Piening BD, Bjornson E, Hallström BM, Groen AK, Ferrannini E, Laakso M, Snyder M, Blüher M, Uhlen M, Nielsen J, Smith U, Serlie MJ, Boren J, Mardinoglu A. 2016. Integrated Network Analysis Reveals an Association between Plasma Mannose Levels and Insulin Resistance. *Cell Metab* **24**:172–184. doi:10.1016/J.CMET.2016.05.026
- Li C, Yu SSB. 2016. Rab proteins as regulators of lipid droplet formation and lipolysis. *Cell Biol Int* **40**:1026–1032. doi:10.1002/CBIN.10650
- Li Dongfang, Zhao YG, Li Di, Zhao H, Huang J, Miao G, Feng D, Liu P, Li Dong, Zhang H. 2019. The ER-Localized Protein DFCP1 Modulates ER-Lipid Droplet Contact Formation. *Cell Rep* **27**:343-358.e5. doi:10.1016/J.CELREP.2019.03.025
- Li G, Marlin MC. 2015. Rab family of GTPases. *Methods Mol Biol* **1298**:1–15. doi:10.1007/978-1-4939-2569-8_1/COVER
- Lin D, Chun TH, Kang L. 2016. Adipose extracellular matrix remodelling in obesity and insulin resistance. *Biochem Pharmacol* **119**:8–16. doi:10.1016/J.BCP.2016.05.005
- Liu J, Lu W, Shi B, Klein S, Su X. 2019. Peroxisomal regulation of redox homeostasis and adipocyte metabolism. *Redox Biol* **24**:101167.

- doi:10.1016/J.REDOX.2019.101167
- Liu P, Ying Y, Zhao Y, Mundy DI, Zhu M, Anderson RGW. 2004. Chinese hamster ovary K2 cell lipid droplets appear to be metabolic organelles involved in membrane traffic. *J Biol Chem* **279**:3787–3792. doi:10.1074/JBC.M311945200
- Liu S, Storrie B. 2015. How Rab proteins determine Golgi structure. *Int Rev Cell Mol Biol* **315**:1–22. doi:10.1016/BS.IRCMB.2014.12.002
- Lodhi IJ, Semenkovich CF. 2014. Peroxisomes: A Nexus for Lipid Metabolism and Cellular Signaling. *Cell Metab* **19**:380–392. doi:10.1016/J.CMET.2014.01.002
- Luo L, Liu M. 2016. Adipose tissue in control of metabolism. *J Endocrinol* **231**:R77–R99. doi:10.1530/JOE-16-0211
- Lupashin V V., Waters MG. 1997. t-SNARE activation through transient interaction with a rab-like guanosine triphosphatase. *Science* **276**:1255–1258. doi:10.1126/SCIENCE.276.5316.1255
- Lürick A, Gao J, Kuhlee A, Yavavli E, Langemeyer L, Perz A, Raunser S, Ungermann C. 2017. Multivalent Rab interactions determine tether-mediated membrane fusion. *Mol Biol Cell* **28**:322–332. doi:10.1091/MBC.E16-11-0764
- Lynes MD, Tseng YH. 2018. Deciphering adipose tissue heterogeneity. *Ann N Y Acad Sci* **1411**:5–20. doi:10.1111/NYAS.13398
- Malagon M, Díaz-Ruiz A, Guzman-Ruiz R, Jimenez-Gomez Y, Moreno N, Garcia-Navarro S, Vazquez-Martinez R, Peinado J. 2014. Adipobiology for Novel Therapeutic Approaches in Metabolic Syndrome. *Curr Vasc Pharmacol* **11**:954–967. doi:10.2174/15701611113116660170
- Martin S, Driessen K, Nixon SJ, Zerial M, 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. doi:10.1074/JBC.M506651200
- Martínez-Menárguez JA, Geuze HJ, Slot JW, Klumperman J. 1999. Vesicular tubular clusters between the ER and Golgi mediate concentration of soluble secretory proteins by exclusion from COPI-coated vesicles. *Cell* **98**:81–90. doi:10.1016/S0092-8674(00)80608-X
- Matsui T, Ohbayashi N, Fukuda M. 2012. The Rab interacting lysosomal protein (RILP) homology domain functions as a novel effector domain for small

- GTPase Rab36: Rab36 regulates retrograde melanosome transport in melanocytes. *J Biol Chem* **287**:28619–28631. doi:10.1074/JBC.M112.370544
- Medici V, McClave SA, Miller KR. 2015. Common Medications Which Lead to Unintended Alterations in Weight Gain or Organ Lipotoxicity. *Curr Gastroenterol Rep* **18**:1–12. doi:10.1007/S11894-015-0479-4/TABLES/1
- Melo EP, Konno T, Farace I, Awadelkareem MA, Skov LR, Teodoro F, Sancho TP, Paton AW, Paton JC, Fares M, Paulo PMR, Zhang X, Avezov E. 2022. Stress-induced protein disaggregation in the endoplasmic reticulum catalysed by BiP. *Nat Commun* **13**. doi:10.1038/S41467-022-30238-2
- Melo RCN, Dvorak AM. 2012. Lipid body-phagosome interaction in macrophages during infectious diseases: host defense or pathogen survival strategy? *PLoS Pathog* **8**:6. doi:10.1371/JOURNAL.PPAT.1002729
- Meyers A, Weiskittel TM, Dalhaimer P. 2017. Lipid Droplets: Formation to Breakdown. *Lipids* **52**:465–475. doi:10.1007/S11745-017-4263-0
- Miaczynska M, Pelkmans L, Zerial M. 2004. Not just a sink: endosomes in control of signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* **16**:400–406. doi:10.1016/J.CEB.2004.06.005
- Moreno-Castellanos N, Rodríguez A, Rabanal-Ruiz Y, Fernández-Vega A, López-Miranda J, Vázquez-Martínez R, Frühbeck G, Malagón MM. 2017. The cytoskeletal protein septin 11 is associated with human obesity and is involved in adipocyte lipid storage and metabolism. *Diabetologia* **60**:324–335. doi:10.1007/s00125-016-4155-5
- Morigny P, Boucher J, Arner P, Langin D. 2021. Lipid and glucose metabolism in white adipocytes: pathways, dysfunction and therapeutics. *Nat Rev Endocrinol* **17**:276–295. doi:10.1038/S41574-021-00471-8
- Moro C, Galitzky J, Sengenès C, Crampes F, Lafontan M, Berlan M. 2004. Functional and pharmacological characterization of the natriuretic peptide-dependent lipolytic pathway in human fat cells. *J Pharmacol Exp Ther* **308**:984–992. doi:10.1124/JPET.103.060913
- Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. 2011. New powers of brown fat: fighting the metabolic syndrome. *Cell Metab* **13**:238–240. doi:10.1016/J.CMET.2011.02.009
- Nettebrock NT, Bohnert M. 2020. Born this way - Biogenesis of lipid droplets from

- specialized ER subdomains. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* **1865**. doi:10.1016/J.BBALIP.2019.04.008
- Nijman SMB, Luna-Vargas MPA, Velds A, Brummelkamp TR, Dirac AMG, Sixma TK, Bernards R. 2005. A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* **123**:773–786. doi:10.1016/J.CELL.2005.11.007
- Ntambi JM, Young-Cheul K. 2000. Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr* **130**:3122S-3126S. doi:10.1093/jn/130.12.3122S
- Oakes SA, Papa FR. 2015. The Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Human Pathology. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012513-104649> **10**:173–194. doi:10.1146/ANNUREV-PATHOL-012513-104649
- Oikonomou EK, Antoniadou C. 2018. The role of adipose tissue in cardiovascular health and disease. *Nat Rev Cardiol* **16**:83–99. doi:10.1038/s41569-018-0097-6
- Olzmann JA, Carvalho P. 2018. Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat Rev Mol Cell Biol* **20**:137–155. doi:10.1038/s41580-018-0085-z
- Olzmann JA, Richter CM, Kopito RR. 2013. Spatial regulation of UBXD8 and p97/VCP controls ATGL-mediated lipid droplet turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**:1345–1350. doi:10.1073/PNAS.1213738110/-/DCSUPPLEMENTAL/PNAS.201213738SI.PDF
- Oprins A, Duden R, Kreis TE, Geuze HJ, Slot JW. 1993. Beta-COP localizes mainly to the cis-Golgi side in exocrine pancreas. *J Cell Biol* **121**:49–60. doi:10.1083/JCB.121.1.49
- Otto TC, Lane MD. 2008. Adipose Development: From Stem Cell to Adipocyte. <https://doi.org/10.1080/10409230591008189> **40**:229–242. doi:10.1080/10409230591008189
- Özcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Özdelen E, Tuncman G, Görgün C, Glimcher LH, Hotamisligil GS. 2004. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science (80-)* **306**:457–461. doi:10.1126/SCIENCE.1103160/SUPPL_FILE/OZCAN.SOM.REV.PDF
- Ozeki S, Cheng J, Tauchi-Sato K, Hatano N, Taniguchi H, 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.

doi:10.1242/JCS.02401

- Parducho KR. 2019. Focus: Organelles: Organelle Contact Sites: From Molecular Mechanism to Disease. *Yale J Biol Med* **92**:569.
- Patni N, Garg A. 2015. Congenital generalized lipodystrophies—new insights into metabolic dysfunction. *Nat Rev Endocrinol* 2015 119 **11**:522–534. doi:10.1038/nrendo.2015.123
- Pfeffer SR. 2017. Rab GTPases: Master regulators that establish the secretory and endocytic pathways. *Mol Biol Cell*. doi:10.1091/mbc.E16-10-0737
- Phillips MJ, Voeltz GK. 2016. Structure and function of ER membrane contact sites with other organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**:69–82. doi:10.1038/NRM.2015.8
- Phosat C, Panprathip P, Chumpathat N, Prangthip P, Chantratita N, Soonthornworasiri N, Puduang S, Kwanbunjan K. 2017. Elevated C-reactive protein, interleukin 6, tumor necrosis factor alpha and glycemic load associated with type 2 diabetes mellitus in rural Thais: A cross-sectional study. *BMC Endocr Disord* **17**:1–8. doi:10.1186/S12902-017-0189-Z/TABLES/3
- Pol A, Gross SP, Parton RG. 2014. Review: biogenesis of the multifunctional lipid droplet: lipids, proteins, and sites. *J Cell Biol* **204**:635–646. doi:10.1083/JCB.201311051
- Pulido MR, Diaz-Ruiz A, Jiménez-Gómez Y, Garcia-Navarro S, Gracia-Navarro F, Tinahones F, López-Miranda J, Frühbeck G, Vázquez-Martínez R, Malagón MM. 2011. Rab18 dynamics in adipocytes in relation to lipogenesis, lipolysis and obesity. *PLoS One* **6**:e22931. doi:10.1371/journal.pone.0022931
- Pulido MR, Rabanal-Ruiz Y, Almabouada F, Díaz-Ruiz A, Burrell MA, Vázquez MJ, Castaño JP, Kineman RD, Luque RM, Diéguez C, Vázquez-Martínez R, Malagón MM. 2012. Nutritional, hormonal, and depot-dependent regulation of the expression of the small GTPase Rab18 in rodent adipose tissue. *J Mol Endocrinol* **50**:19–29. doi:10.1530/JME-12-0140
- Pylypenko O, Hammich H, Yu IM, Houdusse A. 2017. Rab GTPases and their interacting protein partners: Structural insights into Rab functional diversity. <https://doi.org/10.1080/2154124820171336191> **9**:22–48. doi:10.1080/21541248.2017.1336191

- Quiñones M, Al-Massadi O, Folgueira C, Bremser S, Gallego R, Torres-Leal L, Haddad-Tóvolli R, García-Caceres C, Hernandez-Bautista R, Lam BYH, Beiroa D, Sanchez-Rebordelo E, Senra A, Malagon JA, Valerio P, Fondevila MF, Fernø J, Malagon MM, Contreras R, Pfluger P, Brüning JC, Yeo G, Tschöp M, Diéguez C, López M, Claret M, Kloppenburg P, Sabio G, Nogueiras R. 2018. p53 in AgRP neurons is required for protection against diet-induced obesity via JNK1. *Nat Commun* 2018 91 **9**:1–16. doi:10.1038/s41467-018-05711-6
- Ratbi I, Falkenberg KD, Sommen M, Al-Sheqaih N, Guaoua S, Vandeweyer G, Urquhart JE, Chandler KE, Williams SG, Roberts NA, El Alloussi M, Black GC, Ferdinandusse S, Ramdi H, Heimler A, Fryer A, Lynch SA, Cooper N, Ong KR, Smith CEL, Inglehearn CF, Mighell AJ, Elcock C, Poulter JA, Tischkowitz M, Davies SJ, Sefiani A, Mironov AA, Newman WG, Waterham HR, Van Camp G. 2015. Heimler Syndrome Is Caused by Hypomorphic Mutations in the Peroxisome-Biogenesis Genes PEX1 and PEX6. *Am J Hum Genet* **97**:535–545. doi:10.1016/J.AJHG.2015.08.011
- Reddy P, Lent-Schochet D, Ramakrishnan N, McLaughlin M, Jialal I. 2019. Metabolic syndrome is an inflammatory disorder: A conspiracy between adipose tissue and phagocytes. *Clin Chim Acta* **496**:35–44. doi:10.1016/J.CCA.2019.06.019
- Reue K. 2011. A thematic review series: lipid droplet storage and metabolism: from yeast to man. *J Lipid Res* **52**:1865–1868. doi:10.1194/JLR.E020602
- Rodeheffer MS, Birsoy K, Friedman JM. 2008. Identification of White Adipocyte Progenitor Cells In Vivo. *Cell* **135**:240–249. doi:10.1016/j.cell.2008.09.036
- Rodríguez A, Ezquerro S, Méndez-Giménez L, Becerril S, 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. doi:10.1152/ajpendo.00297.2015
- Rosen ED, Spiegelman BM. 2006. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nat* 2006 4447121 **444**:847–853. doi:10.1038/nature05483
- 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**:801–810. doi:10.1083/JCB.201112098

- Rowe ER, Mimmack ML, Barbosa AD, Haider A, Isaac I, Ouberai MM, Thiam AR, Patel S, Saudek V, Siniossoglou S, Savage DB. 2016. Conserved Amphipathic Helices Mediate Lipid Droplet Targeting of Perilipins 1–3. *J Biol Chem* **291**:6664. doi:10.1074/JBC.M115.691048
- Rutkowski JM, Stern JH, Scherer PE. 2015. The cell biology of fat expansion. *J Cell Biol* **208**:501–512. doi:10.1083/JCB.201409063
- Rydén M, Dicker A, Van Harmelen V, Hauner H, Brunnberg M, Perbeck L, Lönnqvist F, Arner P. 2002. Mapping of early signaling events in tumor necrosis factor- α -mediated lipolysis in human fat cells. *J Biol Chem* **277**:1085–1091. doi:10.1074/JBC.M109498200
- Salo VT, Belevich I, Li S, Karhinen L, Vihinen H, Vigouroux C, Magré J, Thiele C, Hölttä-Vuori M, Jokitalo E, Ikonen E. 2016. Seipin regulates ER-lipid droplet contacts and cargo delivery. *EMBO J* **35**:2699–2716. doi:10.15252/EMBJ.201695170
- Salo VT, Li S, Vihinen H, Hölttä-Vuori M, Szkalicity A, Horvath P, Belevich I, Peränen J, Thiele C, Somerharju P, Zhao H, Santinho A, Thiam AR, Jokitalo E, Ikonen E. 2019. Seipin Facilitates Triglyceride Flow to Lipid Droplet and Counteracts Droplet Ripening via Endoplasmic Reticulum Contact. *Dev Cell* **50**:478-493.e9. doi:10.1016/J.DEVCEL.2019.05.016
- Saltiel AR, Kahn CR. 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **414**:799–806. doi:10.1038/414799A
- Samson SL, Garber AJ. 2014. Metabolic Syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am* **43**:1–23. doi:10.1016/J.ECL.2013.09.009
- Sánchez-Álvarez M, del Pozo MÁ, Bosch M, Pol A. 2022. Insights Into the Biogenesis and Emerging Functions of Lipid Droplets From Unbiased Molecular Profiling Approaches. *Front cell Dev Biol* **10**. doi:10.3389/FCELL.2022.901321
- Sánchez-Ceinos J, Guzmán-Ruiz R, Rangel-Zúñiga OA, López-Alcalá J, Moreno-Caño E, Del Río-Moreno M, Romero-Cabrera JL, Pérez-Martínez P, Maymo-Masip E, Vendrell J, Fernández-Veledo S, Fernández-Real JM, Laurencikiene J, Rydén M, Membrives A, Luque RM, López-Miranda J, Malagón MM. 2021. Impaired mRNA splicing and proteostasis in preadipocytes in obesity-related metabolic disease. *Elife* **10**. doi:10.7554/ELIFE.65996

- Saponaro C, Gaggini M, Carli F, Gastaldelli A. 2015. The Subtle Balance between Lipolysis and Lipogenesis: A Critical Point in Metabolic Homeostasis. *Nutr* 2015, Vol 7, Pages 9453-9474 **7**:9453–9474. doi:10.3390/NU7115475
- Scheel AK, Espelage L, Chadt A. 2022. Many Ways to Rome: Exercise, Cold Exposure and Diet-Do They All Affect BAT Activation and WAT Browning in the Same Manner? *Int J Mol Sci* **23**. doi:10.3390/IJMS23094759
- Schoettl T, Fischer IP, Ussar S. 2018. Heterogeneity of adipose tissue in development and metabolic function. *J Exp Biol* **221**. doi:10.1242/JEB.162958
- Schrader M, Kamoshita M, Islinger M. 2020. Organelle interplay-peroxisome interactions in health and disease. *J Inherit Metab Dis* **43**:71–89. doi:10.1002/JIMD.12083
- Seijkens T, Kusters P, Chatzigeorgiou A, Chavakis T, Lutgens E. 2014. Immune cell crosstalk in obesity: a key role for costimulation? *Diabetes* **63**:3982–3991. doi:10.2337/DB14-0272
- Semerdjieva S, Shortt B, Maxwell E, Singh S, Fonarev P, Hansen J, Schiavo G, Grant BD, Smythe E. 2008. Coordinated regulation of AP2 uncoating from clathrin-coated vesicles by rab5 and hRME-6. *J Cell Biol* **183**:499–511. doi:10.1083/JCB.200806016
- Shu Q, Lennemann NJ, Sarkar SN, Sadovsky Y, Coyne CB. 2015. ADAP2 Is an Interferon Stimulated Gene That Restricts RNA Virus Entry. *PLoS Pathog* **11**. doi:10.1371/JOURNAL.PPAT.1005150
- Silva KR, Côrtes I, Liechocki S, Carneiro JRI, Souza AAP, Borojevic R, Maya-Monteiro CM, Baptista LS. 2017. Characterization of stromal vascular fraction and adipose stem cells from subcutaneous, preperitoneal and visceral morbidly obese human adipose tissue depots. *PLoS One* **12**:e0174115. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0174115
- Silva KR, Liechocki S, Carneiro JR, Claudio-Da-Silva C, Maya-Monteiro CM, Borojevic R, Baptista LS. 2015. Stromal-vascular fraction content and adipose stem cell behavior are altered in morbid obese and post bariatric surgery ex-obese women. *Stem Cell Res Ther* **6**. doi:10.1186/S13287-015-0029-X
- Simmen T, Tagaya M. 2017. Organelle Communication at Membrane Contact Sites (MCS): From Curiosity to Center Stage in Cell Biology and Biomedical

- Research. *Adv Exp Med Biol* **997**:1–12. doi:10.1007/978-981-10-4567-7_1
- Smith JJ, Aitchison JD. 2013. Peroxisomes take shape. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**:803–817. doi:10.1038/NRM3700
- Smith SJ, Cases S, Jensen DR, Chen HC, Sande E, Tow B, Sanan DA, Raber J, Eckel RH, Farese R V. 2000. Obesity resistance and multiple mechanisms of triglyceride synthesis in mice lacking Dgat. *Nat Genet* **25**:87–90. doi:10.1038/75651
- Smith U, Kahn BB. 2016. Adipose tissue regulates insulin sensitivity: role of adipogenesis, de novo lipogenesis and novel lipids. *J Intern Med* **280**:465–475. doi:10.1111/JOIM.12540
- Song J, Mizrak A, Lee C-W, Cicconet M, Lai ZW, Tang W-C, Lu C-H, Mohr SE, Farese R V., Walther TC. 2022. Identification of two pathways mediating protein targeting from ER to lipid droplets. *Nat Cell Biol* **24**. doi:10.1038/S41556-022-00974-0
- Soni KG, Mardones GA, Sougrat R, Smirnova E, Jackson CL, Bonifacino JS. 2009. Coatamer-dependent protein delivery to lipid droplets. *J Cell Sci* **122**:1834–1841. doi:10.1242/jcs.045849
- Sönnichsen B, De Renzis S, Nielsen E, Rietdorf J, 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**:901–913. doi:10.1083/JCB.149.4.901
- Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, Blomqvist L, Hoffstedt J, Näslund E, Britton T, Concha H, Hassan M, Rydén M, Frisén J, Arner P. 2008. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nat* **453**:783–787. doi:10.1038/nature06902
- Speight P, Silverman M. 2005. Diacylglycerol-activated Hmunc13 serves as an effector of the GTPase Rab34. *Traffic* **6**:858–865. doi:10.1111/J.1600-0854.2005.00321.X
- Srikanthan K, Feyh A, Visweshwar H, Shapiro JI, Sodhi K. 2016. Systematic Review of Metabolic Syndrome Biomarkers: A Panel for Early Detection, Management, and Risk Stratification in the West Virginian Population. *Int J Med Sci* **13**:25–38. doi:10.7150/IJMS.13800
- Stenmark H. 2009. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**:513–25. doi:10.1038/nrm2728

- Subramanian K, Meyer T. 1997. Calcium-induced restructuring of nuclear envelope and endoplasmic reticulum calcium stores. *Cell* **89**:963–971. doi:10.1016/S0092-8674(00)80281-0
- Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. 2011. Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest* **121**:2094–2101. doi:10.1172/JCI45887
- Sun P, Yamamoto H, Suetsugu S, Miki H, Takenawa T, Endo T. 2003. Small GTPase Rac/Rab34 is associated with membrane ruffles and macropinosomes and promotes macropinosome formation. *J Biol Chem* **278**:4063–4071. doi:10.1074/jbc.M208699200
- Sztalryd C, Brasaemle DL. 2017. The perilipin family of lipid droplet proteins: Gatekeepers of intracellular lipolysis. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* **1862**:1221–1232. doi:10.1016/J.BBALIP.2017.07.009
- Tang QQ, Lane MD. 2012. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annu Rev Biochem* **81**:715–736. doi:10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-052110-115718
- Tauchi-Sato K, Ozeki S, Houjou T, Taguchi R, Fujimoto T. 2002. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique fatty acid composition. *J Biol Chem* **277**:44507–44512. doi:10.1074/jbc.M207712200
- Thiam AR, Dugail I. 2019. Lipid droplet-membrane contact sites - From protein binding to function. *J Cell Sci*. doi:10.1242/jcs.230169
- Thompson BR, Lobo S, 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. doi:10.1016/J.MCE.2009.08.015
- Tripathi YB, Pandey V. 2012. Obesity and endoplasmic reticulum (ER) stresses. *Front Immunol* **3**. doi:10.3389/FIMMU.2012.00240
- Valm AM, Cohen S, Legant WR, Melunis J, Hershberg U, Wait E, Cohen AR, Davidson MW, Betzig E, Lippincott-Schwartz J. 2017. Applying systems-level spectral imaging and analysis to reveal the organelle interactome. *Nat* **2017 5467656** **546**:162–167. doi:10.1038/nature22369
- van der Zand A, Braakman I, Geuze HJ, Tabak HF. 2006. The return of the peroxisome. *J Cell Sci* **119**:989–994. doi:10.1242/JCS.02893
- Vance JE. 1990. Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *J Biol Chem* **1990 May 5;265(13)7248-56** PMID 2332429 **265**:7248–56.
- Vanni S. 2017. Intracellular lipid droplets: From structure to function. *Lipid*

doi:10.1177/1178635317745518/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_1178635317745518-FIG1.JPEG

- Vetter IR, Wittinghofer A. 2001. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* **294**:1299–1304. doi:10.1126/SCIENCE.1062023
- Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, Taittonen M, Laine J, Savisto N-J, Enerbäck S, Nuutila P. 2009. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med* **360**:1518–1525. doi:10.1056/NEJM0A0808949
- Virtue S, Vidal-Puig A. 2010. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome — An allostatic perspective. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* **1801**:338–349. doi:10.1016/J.BBALIP.2009.12.006
- Vogel Hertzell A, Bennaars-Eiden A, Bernlohr DA. 2002. Increased lipolysis in transgenic animals overexpressing the epithelial fatty acid binding protein in adipose cells. *J Lipid Res* **43**:2105–2111. doi:10.1194/JLR.M200227-JLR200
- Walther TC, Farese R V. 2012. Lipid Droplets and Cellular Lipid Metabolism. *Annu Rev Biochem* **81**:687–714. doi:10.1146/annurev-biochem-061009-102430
- Wanders RJA, Klouwer FCC, Ferdinandusse S, Waterham HR, Poll-Thé BT. 2017. Clinical and laboratory diagnosis of peroxisomal disorders. *Methods Mol Biol* **1595**:329–342. doi:10.1007/978-1-4939-6937-1_30/FIGURES/1
- Wanders RJA, Visser WF, Van Roermund CWT, Kemp S, Waterham HR. 2007. The peroxisomal ABC transporter family. *Pflugers Arch Eur J Physiol* **453**:719–734. doi:10.1007/S00424-006-0142-X/FIGURES/4
- Wandinger-Ness A, Zerial M. 2014. Rab proteins and the compartmentalization of the endosomal system. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6**:a022616. doi:10.1101/CSHPERSPECT.A022616
- Wang T, Hong W. 2002. Interorganellar regulation of lysosome positioning by the Golgi apparatus through Rab34 interaction with Rab-interacting lysosomal protein. *Mol Biol Cell* **13**:4317–4332. doi:10.1091/mbc.E02-05-0280
- Wang Z V., Scherer PE. 2016. Adiponectin, the past two decades. *J Mol Cell Biol* **8**:93–100. doi:10.1093/JMCB/MJW011
- Wang YC, Peterson SE, Loring JF. 2014. Protein post-translational modifications

- and regulation of pluripotency in human stem cells. *Cell Res* **24**:143–160. doi:10.1038/CR.2013.151
- Waterham HR, Ferdinandusse S, Wanders RJA. 2016. Human disorders of peroxisome metabolism and biogenesis. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* **1863**:922–933. doi:10.1016/J.BBAMCR.2015.11.015
- White UA, Stephens JM. 2010. Transcriptional factors that promote formation of white adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol* **318**:10–14. doi:10.1016/J.MCE.2009.08.023
- Wickner W SR. 2008. Membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol* **15**:658–664.
- Wilfling F, Haas JT, Walther TC, Jr RVF. 2014a. Lipid droplet biogenesis. *Curr Opin Cell Biol* **29**:39–45. doi:10.1016/J.CEB.2014.03.008
- Wilfling F, Thiam AR, Olarte MJ, Wang J, Beck R, Gould TJ, Allgeyer ES, Pincet F, Bewersdorf J, Farese R V., Walther TC. 2014b. Arf1/COPI machinery acts directly on lipid droplets and enables their connection to the ER for protein targeting. *Elife* **3**. doi:10.7554/ELIFE.01607
- Wilfling F, Wang H, Haas JT, Krahmer N, Gould TJ, Uchida A, Cheng JX, Graham M, Christiano R, Fröhlich F, Liu X, Buhman KK, Coleman RA, Bewersdorf J, Farese R V., Walther TC. 2013. Triacylglycerol synthesis enzymes mediate lipid droplet growth by relocalizing from the ER to lipid droplets. *Dev Cell* **24**:384–399. doi:10.1016/j.devcel.2013.01.013
- Xie L, Boyle D, Sanford D, Scherer PE, Pessin JE, Mora S. 2006. Intracellular trafficking and secretion of adiponectin is dependent on GGA-coated vesicles. *J Biol Chem* **281**:7253–7259. doi:10.1074/JBC.M511313200
- Xie L, O'Reilly CP, Chapes SK, Mora S. 2008. Adiponectin and leptin are secreted through distinct trafficking pathways in adipocytes. *Biochim Biophys Acta* **1782**:99–108. doi:10.1016/J.BBADIS.2007.12.003
- Xu B, Chen L, Zhan Y, Marquez KNS, Zhuo L, Qi S, Zhu J, He Y, Chen X, Zhang H, Shen Y, Chen G, Gu J, Guo Y, Liu S, Xie T. 2022. The Biological Functions and Regulatory Mechanisms of Fatty Acid Binding Protein 5 in Various Diseases. *Front cell Dev Biol* **10**. doi:10.3389/FCELL.2022.857919
- Xu D, Li Yuqi, Wu L, Li Ying, Zhao D, Yu J, Huang T, Ferguson C, Parton RG, Yang H, Li P. 2018. Rab18 promotes lipid droplet (LD) growth by tethering the ER to LDs through SNARE and NRZ interactions. *J Cell Biol* **217**:975–995. doi:10.1083/JCB.201704184

- Yang L, Ding Y, Chen Y, Zhang S, Huo C, Wang Y, Yu J, Zhang P, Na H, Zhang H, Ma Y, Liu P. 2012. The proteomics of lipid droplets: structure, dynamics, and functions of the organelle conserved from bacteria to humans. *J Lipid Res* **53**:1245–1253. doi:10.1194/JLR.R024117
- Yang W, Thein S, Wang X, Bi X, Ericksen RE, Xu F, Han W. 2014. BSCL2/seipin regulates adipogenesis through actin cytoskeleton remodelling. *Hum Mol Genet* **23**:502–513. doi:10.1093/HMG/DDT444
- Yilmaz M, Claiborn KC, Hotamisligil GS. 2016. De Novo Lipogenesis Products and Endogenous Lipokines. *Diabetes* **65**:1800. doi:10.2337/DB16-0251
- Zehmer JK, Huang Y, Peng G, Pu J, Anderson RGW, Liu P. 2009. A role for lipid droplets in inter-membrane lipid traffic. *Proteomics* **9**:914–921. doi:10.1002/PMIC.200800584
- Zhang C, Liu P. 2019. The New Face of the Lipid Droplet: Lipid Droplet Proteins. *Proteomics* **19**. doi:10.1002/PMIC.201700223
- Zhen Y, Stenmark H. 2015. Cellular functions of Rab GTPases at a glance. *J Cell Sci* **128**:3171–3176. doi:10.1242/JCS.166074