

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



**EL PAPEL DEL COLESTEROL EN LA
FUNCIONALIDAD DE LOS LIPID RAFTS Y
SU REPERCUSIÓN EN LA
ADIPOGÉNESIS**

TESIS DOCTORAL

Jana Sánchez Wandelmer

2009

Antonio Jiménez Ruiz, Director del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Alcalá

INFORMA:

Que D^a. **Jana Sánchez Wandelmer** ha realizado la Tesis Doctoral titulada EL PAPEL DEL COLESTEROL EN LA FUNCIONALIDAD DE LOS LIPID RAFTS Y SU REPERCUSIÓN EN LA ADIPOGÉNESIS bajo su la dirección de Miguel Ángel Lasunción y Rebeca Busto (Servicio de Bioquímica Investigación del Hospital Ramón y Cajal), dentro del programa de Doctorado *Señalización Celular y Patologías Asociadas* del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Alcalá y, a su juicio, cumple todos los requisitos necesarios para proceder a su defensa pública.

Alcalá de Henares, a 6 de Mayo de 2009

Fdo:

Antonio Jiménez Ruiz

MIGUEL ÁNGEL LASUNCIÓN RIPA, Jefe de Servicio de Bioquímica-Investigación del Hospital Ramón y Cajal y profesor asociado de la Universidad de Alcalá; y REBECA BUSTO DURÁN, Investigadora de la Fundación Biomédica del Hospital Ramón y Cajal en el Servicio de Bioquímica-Investigación.

INFORMAN:

Que D^a. JANA SÁNCHEZ WANDELMER ha realizado la Tesis Doctoral titulada EL PAPEL DEL COLESTEROL EN LA FUNCIONALIDAD DE LOS LIPID RAFTS Y SU REPERCUSIÓN EN LA ADIPOGÉNESIS bajo su dirección en El Servicio de Bioquímica-Investigación del Hospital Ramón y Cajal, dentro del programa de Doctorado SEÑALIZACIÓN CELULAR Y PATOLOGÍAS ASOCIADAS del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Alcalá.

CONSIDERAN:

Que el estudio experimental es original y los resultados satisfactorios para su defensa pública como Tesis Doctoral en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Alcalá..

Alcalá de Henares, a 6 de Mayo de 2009

Fdo:

Miguel Ángel Lasunción Ripa

Rebeca Busto Durán

Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias a la financiación obtenida de los proyectos FIS CP03/00012 (del ISCIII), SAF 2005-07308 y SAF 2008/01104 del Ministerio de Ciencia e Innovación y del CIBER de Obesidad y Nutrición (una iniciativa del ISCIII); a una beca FPI concedida por la Comunidad de Madrid; y a las infraestructuras del Hospital Ramón y Cajal.

*A mis padres
A "la yaya"*

A todos los que ve en la investigación la mejor manera de dedicar su trabajo

“Todo hombre puede ser, si lo propone, escultor de su propio cerebro”

Santiago Ramón y Cajal

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a mis dos directores de tesis.

Al Doctor Miguel Ángel Lasunción, por haberme dado la oportunidad de pasar estos 5 años aprendiendo lo que espero que sea mi oficio. Mi estancia en el laboratorio de Lípidos ha contribuido enormemente a que decida que dedicarme a la ciencia es lo que quiero hacer. Por todos los conocimientos que me has transmitido y por el esfuerzo que sé que me has dedicado, sobre todo al final. GRACIAS.

Por otra parte, nada de lo que he aprendido hubiera sido posible sin el esfuerzo y paciencia de la Doctora Rebeca Busto. Todo lo que diga se quedaría corto pero aún así, gracias porque día a día te has preocupado de que diera un paso más en este proceso de formación y de prestarme la ayuda que necesitaba en cada momento. En fin, todo lo que sé de ciencia ha sido gracias a ti. Siempre tendré un muy buen recuerdo de alguien que para mi ha sido más que una "jefa". La verdad es que espero que tengas un buen futuro porque te lo mereces.

Quiero destacar que los dos sois un ejemplo de trabajo y dedicación. He aprendido mucho de los dos.

A Gema y Alberto, agradecerles el tiempo que han empleado en las determinaciones de lípidos. Sin vuestra labor esta tesis estaría más que coja.

A Sonia, por su amistad, confianza y porque trabajar contigo ha sido más que fácil, ha sido un placer. Gracias por todos los buenos momentos que hemos pasado y por alegrarme la vida en el laboratorio. En fin, que te voy a echar mucho de menos.

A Geli por su amistad, por las LDL y por ese LPDS tan 0 patatero.

A la gente que ha compartido laboratorio conmigo: Paquita, Óscar, Miguel, Lola, Lydia, Irene, Sergio, María, Néstor, Paloma y Nuria, por los buenos ratos que me habéis hecho pasar.

A las chicas del array, M^a Eugenia, Lorena y Vero, por resolver todas esas "dudillas" de biología molecular; y en especial, a Lidia, por sus consejos en ligación, imprescindibles en los últimos momentos. A Javier, por todo lo anterior, por sus consejos informáticos y por portarse como un compañero más.

A Diego y Toñi por su experiencia, sensatez y compañerismo.

Al laboratorio de proteínas, David, Edurne, Nata, Irene, Macarena, Elena y Víctor porque siempre que he necesitado cualquier cosa, me la habéis resuelto.

A todos los de "Neuro", por todos los favorillos que me habéis hecho a lo largo de estos cinco años; en especial, a Rosa, porque no sé si te acordarás, pero fuiste tú la que me enseñó a hacer inmunos.

Al laboratorio de M^a Ángeles Mena por permitirme el uso de su sonicador para realizar los experimentos del gradiente, que han sido muchos.

Al laboratorio del Dr. Eduardo Arilla y en especial, a Alberto Hernández por los ensayos de "binding" y de la actividad adenilato ciclasa, que forman una parte determinante de los resultados.

A Martin Giera por el análisis de los esteroides por GC/MS que nos ha permitido concretar los efectos de algunos inhibidores sobre la colesterologénesis.

Al laboratorio del Doctor Andreu Palou por acogerme durante 15 días. En especial, a Ana M^a Rodríguez por enseñarme la técnica de extracción de MEFs. Tengo muy buen recuerdo de mi corta visita.

En definitiva, a toda la gente con los que durante este tiempo he compartido lugar de trabajo: Sara, Gema, Patri, Jonathan, Cova, Carol, Nuria, Linder, Gema, Mariano, Catí, etc. Sería absurdo hacer una lista de nombres, de toda la ayuda que me habéis prestado durante este tiempo y de todos los momentos que hemos compartido, así que GRACIAS POR TODO.

A mis amigos de fuera del laboratorio y a mi gente del pueblo. Porque me alegro mucho de que personas como vosotros forméis una de las partes más importantes de mi vida.

Finalmente, a mis padres, porque siempre me habéis dejado decidir, y creo que si lo he hecho más o menos bien ha sido gracias a lo que me habéis enseñado. Que sepáis que los padres no se eligen, pero si tuviera que elegirlos, os elegiría a vosotros.

Índice

Abreviaturas	1
Summary/Resumen	7
Introducción	11
1. Ruta de biosíntesis del colesterol-colesterogénesis	12
1.1. Regulación de la homeostasis de colesterol. SREBPs.....	12
1.2. Desórdenes genéticos asociados a deficiencias en la síntesis de colesterol.....	13
1.3. Inhibidores de la colesterogénesis.....	14
1.3.1. <i>Inhibidores de la HMG-CoA reductasa</i>	14
1.3.2. <i>Inhibidores de la escualeno sintasa</i>	15
1.3.3. <i>Inhibidores de la lanosterol 14α-desmetilasa</i>	15
1.3.4. <i>Inhibidores de la esterol Δ^7-reductasa</i>	15
1.3.5. <i>Inibidores de la esterol Δ^{24}-reductasa</i>	15
1.3.6. <i>Otros inhibidores. El haloperidol</i>	15
2. Microdominios de membrana. “Lipid rafts” y caveolas	18
2.1. Caveolas.....	20
2.2. Composición lipídica.....	20
2.3. Composición proteica.....	20
2.3.1. <i>Caveolinas</i>	20
2.3.2. <i>Flotilinas</i>	21
2.3.3. <i>Proteínas G</i>	21
2.3.4. <i>Familia Src</i>	21
2.3.5. <i>Proteínas transmembrana</i>	21
2.3.6. <i>Proteínas ancladas a GPI</i>	21
2.4. Métodos de aislamiento.....	22
2.4.1. <i>Métodos con detergentes</i>	22
2.4.2. <i>Métodos sin detergentes</i>	22
2.5. Funciones.....	23

3. Alteración del contenido de colesterol en membrana.....	23
4. Efectos de la reducción del contenido de colesterol sobre la estructura, propiedades y funcionalidad de los “lipid rafts”	24
4.1. Efectos sobre la estructura y propiedades. Modelos de membrana.....	24
4.2. Efectos sobre la funcionalidad. Alteraciones de la señalización celular.....	25
5. Señalización a través del receptor de insulina en “lipid rafts”. Importancia del colesterol.....	26
5.1. El receptor de insulina en adipocitos maduros.....	28
5.2. El receptor de insulina en cerebro.....	28
6. Señalización a través del receptor de somatostatina. Importancia del colesterol.....	29
7. Adipogénesis.....	31
7.1. Factores de transcripción implicados en adipogénesis.....	32
7.1.1. C/EBPs.....	32
7.1.1.1. C/EBP β y δ	32
7.1.1.2. C/EBP α	33
7.1.1.3. CHOP-10.....	34
7.1.2. PPAR γ	34
7.1.3. SREBP-1c.....	34
7.1.4. LXR α	35
7.1.5. Interacción entre distintos factores.....	35
7.2. Fases del proceso de diferenciación.....	37
7.2.1. Parada del crecimiento celular o inhibición por contacto.....	37
7.2.2. Expansión clonal.....	37
7.2.3. Cambios en la expresión de genes tempranos.....	37
7.2.4. Diferenciación terminal.....	38
7.3. Vías de señalización implicadas en adipogénesis.....	38
7.3.1. Vía de PKB/Akt.....	38
7.3.2. Vía de ERK MAPK.....	38
7.3.3. Vía de p38 MAPK.....	39

7.3.4. Vía de JNK MAPK.....	40
7.4. El receptor de insulina en preadipocitos y adipogénesis.....	40
7.5. Inhibición de la biosíntesis de colesterol y adipogénesis.....	41
8. El ciclo celular.....	41
8.1. Importancia del colesterol en el ciclo celular.....	42
8.2. Promotor de la ciclina B1 (pCyc-B1): Regulación y elementos de respuesta implicados.....	43
8.2.1. AP-2.....	44
8.2.2. NF-Y.....	44
8.2.3. Sp1.....	45
8.2.4. USF.....	45
8.2.5. SREBP.....	46
8.3. Regulación del promotor de la ciclina B1 por colesterol.....	46
Objetivos.....	51
Material y Métodos.....	55
1. Inhibidores de la biosíntesis de colesterol y esteroides.....	55
2. Líneas y cultivos celulares	55
2.1. Células 3T3-L1.....	55
2.2. Células SH-SY5Y.....	55
2.3. Células MOLT-4.....	55
3. Obtención de lipoproteínas (LDL y Dil-LDL) y suero deficiente en lipoproteínas.....	55
4. Diferenciación de células 3T3-L1 a adipocitos.....	56
5. Tinción con Oil red-O y determinación de su absorbancia a 510 nm.....	56
6. Análisis del contenido de colesterol y triglicéridos.....	56
7. Determinación del contenido y la síntesis de esteroides por HPLC (high-performance liquid chromatography).....	57
8. Análisis de esteroides mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC/MS).....	57
9. Aislamiento de extractos celulares para el análisis de proteínas.....	57
9.1. Extractos citoplásmicos y nucleares.....	57
9.2. Extractos totales para proteínas fosforiladas.....	58

9.3. Valoración de proteínas.....	58
10. Métodos de concentración de extractos proteicos.....	58
10.1. Precipitación con ácido tricloroacético (TCA).....	58
10.2. Concentración por centrifugación en filtros Centricon®.....	58
11. Aislamiento de membranas.....	58
12. Fraccionamiento de membranas plasmáticas en gradiente de densidad en sacarosa... 58	58
13. Estimulación con insulina.....	59
14. Inmunodetección o Western-blot.....	59
15. Inmunoprecipitación del RI.....	61
16. Marcaje de Tyr¹¹-Somatostatina-14 con Na¹²⁵I.....	61
17. Unión de la somatostatina a sus receptores específicos en membranas de células SH-SY5Y (Ensayos de “Binding”).....	61
18. Determinación de la actividad de la adenilato ciclasa.....	62
19. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo.....	62
19.1. Distribución del ciclo celular.....	62
19.2. Incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU).....	63
20. Inmunocitoquímica.....	63
20.1. Marcaje del gangliósido GM1.....	63
20.2. Tinción con filipina.....	63
20.3. Inmunocitoquímica y microscopía de fluorescencia y confocal.....	63
21. Captación de glucosa.....	64
22. Extracción del RNA total y reacción de transcripción inversa (RT).....	64
23. RT-PCR cuantitativa a tiempo real (q-PCR).....	64
24. Obtención de clones del pCycB1.....	65
25. Mutagénesis dirigida mediante PCR.....	65
26. Ensayos de actividad de promotor.....	67
Resultados.....	71
1. Efecto de la inhibición de la síntesis de colesterol sobre la diferenciación a adipocitos de células 3T3-L1.....	71

1.1.	Efecto de distintos inhibidores sobre la síntesis de colesterol en células 3T3-L1.....	71
1.2.	Efectos del SKF 104976 sobre la acumulación de gotas lipídicas en células 3T3-L1.....	73
1.3.	Efecto del SKF 104976 sobre el contenido de colesterol y triglicéridos en células 3T3-L1 diferenciadas.....	73
1.4.	Estudio del efecto de la inhibición de la síntesis de colesterol sobre la expresión de algunos factores de transcripción implicados en adipogénesis.....	75
	<i>1.4.1. Efecto del SKF104976 sobre la expresión de C/EBPβ durante la adipogénesis de células 3T3-L1.....</i>	<i>75</i>
	<i>1.4.2. Efecto del SKF 104976 sobre la expresión de PPARγ, LXRA y C/EBPα en la adipogénesis de células 3T3-L1.....</i>	<i>76</i>
1.5.	Efecto del SKF 104976 sobre la expresión de proteínas específicas de adipocitos en células 3T3-L1 en diferenciación.....	77
1.6.	Efectos de la inhibición de la colesterogénesis sobre el ciclo celular en adipogénesis.....	79
	<i>1.6.1. Determinación del momento de la diferenciación en que tiene lugar la fase de expansión clonal en células 3T3-L1.....</i>	<i>79</i>
	<i>1.6.2. Efecto de distintos inhibidores de la colesterogénesis sobre la síntesis de DNA durante la fase de expansión clonal en células 3T3-L1 en diferenciación.....</i>	<i>80</i>
	<i>1.6.3. Efectos del AY 9944 sobre la progresión del ciclo celular durante la diferenciación de células 3T3-L1 a adipocitos.....</i>	<i>82</i>
1.7.	Efecto de la inhibición de la colesterogénesis SKF 104976 y AY 9944 sobre la funcionalidad de la vía de ERK y p38 MAPKs en la inducción de la adipogénesis de células 3T3-L1.....	83
1.8.	Implicación de la vía de JNK MAPK en la diferenciación de células 3T3-L1 a adipocitos.....	85
1.9.	Efecto de los inhibidores de la colesterogénesis, SKF 104976 y AY 9944, sobre la funcionalidad de la vía de PKB/Akt en la inducción de la adipogénesis en células 3T3-L1.....	85
1.10.	Efecto de la inhibición de la colesterogénesis sobre la fosforilación de C/EBPβ.....	86
	<i>1.10.1. Efecto de la inhibición de la síntesis de colesterol sobre la fosforilación en Thr188 de C/EBPβ durante la adipogénesis de células 3T3-L1.....</i>	<i>86</i>
	<i>1.10.2. Efecto del AY 9944 sobre la fosforilación de C/EBPβ ante la estimulación de distintas vías de señalización.....</i>	<i>88</i>
2.	Aislamiento de distintas fracciones de membrana e identificación de fracciones correspondientes a “lipid rafts”.....	90
3.	Efecto de la inhibición de la síntesis de colesterol sobre la estructura “lipid rafts”.....	91

3.1. Efecto del SKF 104976 sobre la incorporación de esteroides de nueva síntesis a las distintas regiones de membrana.....	91
3.2. Efecto de distintos inhibidores de la colesterogénesis en la composición en esteroides de las distintas fracciones de membrana en células 3T3-L1.....	93
3.3. Efecto de la inhibición de la colesterogénesis sobre la presencia en “lipid rafts” de distintos componentes específicos de estos microdominios.....	95
3.4. Efecto de la inhibición de la síntesis de colesterol sobre la distribución de caveolina-1 en las distintas fracciones de membrana.....	95
4. Efectos de la inhibición de la colesterogénesis sobre la funcionalidad de la señalización por insulina en células 3T3-L1.....	99
4.1. Localización del RI y otras proteínas de la ruta en los “lipid rafts” de células 3T3-L1.....	99
4.2. Efecto de la inhibición de la colesterogénesis sobre la activación del RI y la localización de la proteína acopladora Fyn en los “lipid rafts”.....	99
4.3. Efecto de la inhibición de la colesterogénesis sobre la activación de la vía de PKB/Akt.....	100
4.4. Efecto de la inhibición de la colesterogénesis sobre la captación de glucosa en células 3T3-L1.....	102
4.5. Localización de la proteína acopladora Fyn en los mismos microdominios que el RI.....	102
5. Efecto del haloperidol sobre la síntesis de colesterol en células SH-SY5Y.....	105
6. Efecto del haloperidol sobre la estructura de los “lipid rafts”.....	107
6.1. Efecto del haloperidol sobre la composición en esteroides en las distintas fracciones de membrana de células SH-SY5Y.....	107
6.2. Efecto del haloperidol sobre la acumulación de colesterol en el interior celular.....	108
6.3. Efecto del haloperidol sobre presencia y distribución del gangliósido GM1 en “lipid rafts”.....	109
6.4. Efecto del haloperidol sobre la distribución de flotilina-1 en las distintas fracciones del gradiente.....	111
7. Efectos del haloperidol sobre la funcionalidad de la señalización por insulina en células SH-SY5Y.....	112
7.1. Efecto del haloperidol sobre la actividad del receptor de insulina.....	112
7.2. Efecto del haloperidol sobre el contenido de Fyn en los “lipid rafts”.....	115
7.3. Efecto del haloperidol sobre la actividad de la vía de PKB/Akt.....	116
8. Efectos del haloperidol sobre la señalización mediada por somatostatina en células SH-SY5Y.....	117
8.1. Efecto del haloperidol sobre la unión de la somatostatina a su receptor	117

8.2. Efecto del haloperidol sobre la actividad adenilato ciclasa	118
9. Efecto del SKF 104976 sobre la expresión de la ciclina B1 en células MOLT-4.....	119
9.1. Búsqueda de posibles elementos de respuesta implicados en la regulación de la expresión de la ciclina B1 por esteroides.....	120
9.2. Efecto del SKF 104976 sobre la expresión de la ciclina B1 con el elemento de respuesta a USF (ERU) mutado.....	122
Discusión.....	127
Conclusiones.....	145
Bibliografía.....	149
Publicaciones.....	171

Abreviaturas

βCDs: β-ciclodextrinas

βMCDs: β-metilciclodextrinas

7-DHC: 7-deshidrocolesterol

8-DHC: 8-deshidrocolesterol

8-DHD: 8-deshidrodeseosterol

ABCA1: *ATP-binding cassette transporter A1* (transportador A1 dependiente de unión a ATP)

ABS: *Antley-Bixler syndrome* (síndrome de Antley-Bixler)

AC: Adenilato ciclasa

ADD1: *Adipocyte determination and differentiation-dependent factor 1* (factor 1 para la determinación y diferenciación de adipocitos)

Akt: *akr/Thymoma viral proto-oncogene protein*

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

AP-2: *Activating enhancer binding protein 2* (proteína 2 de unión al potenciador)

BCIP: *5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate* (5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato)

BMP2: *Bone morphogenic protein-2* (proteína morfogénica ósea 2)

BrdU: 5-bromodeoxiuridina

C/EBP: *CCAAT-enhancer binding protein* (proteínas de unión a los activadores CCAAT)

CBF/NF-Y: *CCAAT binding factor* (factor de unión a CCAAT)

CD: Ciclodextrinas

CDE: *Cell cycle-dependent element* (elemento dependiente de ciclo celular)

Cdks: *Cyclin dependent kinases* (quinasas dependientes de ciclinas)

cDNA: *complementary DNA* (ADNc, ADN copia)

CDPX2: Condrodisplasia punctata dominante asociada al cromosoma X

cpm: cuentas por minuto

CRE: *cAMP response element* (elemento de respuesta a AMPc)

CREB: *CRE binding protein* (proteína de unión a elementos CRE)

CtxB: *Cholera toxin subunit B* (subunidad B de la toxina colérica)

CUP: *C/EBP undifferentiated protein* (proteína indiferenciada de C/EBP)

CHILD: *Congenital hemidysplasia with ichthyosiform erythroderma or nevus and limb defects* (hemidisplasia unilateral congénita)

CHOP-10: *C/EBP homologous protein* (proteína homóloga a C/EBP)

DE: Desviación estándar

DIGs: *Detergent-insoluble glycosphingolipid-enriched membranes* (membranas insolubles en detergentes enriquecidas en glicoesfingolípidos)

DMEM: *Dulbecco's modified Eagle's medium* (medio Eagle Dulbecco's modificado)

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: *Deoxyribonucleic acid* (ADN, ácido deoxirribonucleico)

DPPC: *Dipalmitoil phosphatidyl cholina* (dipalmitoilfosfatidilcolina)

DRMs: *Detergent-resistant membranes* (membranas resistentes a detergentes)

EBP: *Emopamil Binding Protein* (proteína de unión a emopamilo)

EE: Error estándar

ERK1/2: *Extracellular signal-regulated kinase* (quinasa regulada por señales extracelulares)

ERU: Elemento de respuesta a USF

FABP4: *Fatty acid binding protein 4* (proteína de unión a ácidos grasos 4)

FAS: *Fatty acid synthase* (sintasa de ácidos grasos)

FBS: *Foetal bovine serum* (suero bovino fetal)

FITC: Fluoroisotiocianato

G1: *Gap 1* (fase de crecimiento celular y preparación para la replicación del DNA)

G2: *Gap 2* (fase de preparación para la mitosis)

GC/MS: *Gas chromatograph/mass spectrometry* (cromatografía de gases y espectrometría de masas)

GDP: *Guanosin di-phosphate* (guanosín difosfato)

Cdt: *Cytolethal distending toxin*

GLUT-4: *Glucose transporter type 4* (transportador de glucosa tipo 4)

GPCRs: *G protein coupled receptor* (receptor acoplado a proteínas G)

GPI: *Glicosilphosphatidilinositol* (glicosilfosfatidilinositol)

GSK3: *Glycogen synthase kinase 3* (glicógeno sintasa quinasa)

GTP: *Guanosin tri-phosphate* (guanosín trifosfato)

HEM: *Hydrops-ectopic calcification-moth-eaten* (hidropesía fetal y calcificación anómala del tejido condroóseo)

HMG-CoA: Hidroximetilglutaril coenzima A

HPLC: *High-performance liquid chromatography* (cromatografía líquida de alta definición)

HRP: *Horseradish peroxidase* (peroxidasa de rábano picante)

I.S: *Internal standar* (estándar interno)

IGF-1: *Insulin like growth factor 1* (factor de crecimiento semejante a la insulina 1)

IRS-1: *Insulin receptor substrate 1* (sustrato 1 del receptor de insulina)

KO: *Knock out* (noqueado)

LDL: *Light density lipoprotein* (lipoproteínas de baja densidad)

LPDS: *Lipoprotein deficient serum* (suero deficiente en lipoproteínas)

LPL: Lipoproteín lipasa

LXR: *Liver X receptor* (receptor X del hígado)

LXRE: *LXR response element* (elemento de respuesta a LXR)

M: Fase de mitosis

MAPKs: *Mitogen activated protein kinases* (proteínas quinasas activadas por mitógenos)

MEFs: *Mouse embryonic fibroblasts* (fibroblastos embrionarios de ratón)

MKK6: *MAPK kinase kinase 6* (quinasa de la quinasa de la MAPK 6)

NBT: *Nitroblue tetrazolium* (nitroazul de tetrazolio)

NFATc4: *Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 4* (factor nuclear 4 de células T activadas calcineurina dependiente)

NGS: *Normal goat serum* (suero normal de cabra)

NIRKO: *Neuron insulin receptor KO* (KO del receptor de insulina en neuronas)

NMDA: N-metil-D-aspartato

PBS: *Phosphate buffer saline* (Tampón fosfato)

PCR: *Polimerase chain reaction* (reacción en cadena de la polimerasa)

pCycB1: *Cyclin B1 promoter* (promotor de la ciclina B1)

PEPCK: *Phospho-enol pyruvate carboxikinase* (fosfo-enol piruvato carboxiquinasa)

PI(3,4,5)P3: *Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate* (fosfatidil inositol trifosfato)

PI(4,5)P2: *Phosphatidylinositol ,4,5-biphosphate* (fosfatidil inositol bifosfato)

PI3K: *Phosphatidil inositol triphosphate kinase* (quinasa de fosfatidil inositol trifosfato)

PKA: *Protein kinase A* (proteína quinasa A)

PKB: *Protein kinase B* (proteína quinasa B)

PPAR: *Peroxisome proliferator-activated receptor* (receptor activador de la proliferación de los peroxisomas)

PPRE: *PPAR response element* (elemento de respuesta a PPAR)

p-Tyr: *phosphotyrosine* (tirosina fosforilada)

q-PCR: *Quantitative PCR* (PCR cuantitativa)

RE: Retículo endoplásmico

RI: Receptor de Insulina

RIβ: Subunidad β del receptor de insulina

RNA: *Ribonucleic acid* (ARN, ácido ribonucleico)

rRNA: *ribosomal RNA* (ARNr, ARN ribosomal)

RT: *Reverse transcription* (retrotranscripción)

RTf: Receptor de transferrina

RXRs: *Retinoic X receptor* (receptor X del ácido retinoico)

S: Fase de síntesis de DNA

S1P: *Site-1 protease* (proteasa del sitio 1)

S2P: *Site-2 Protease* (proteasa del sitio 2)

SC5D: *Sterol C5-desaturase* (esterol Δ⁵-desaturasa)

SCAP: *SREBP cleavage activating protein* (proteína activadora del procesamiento de SREBP)

SCD: *Stearoyl-CoA desaturase* (estearil CoA desaturasa)

siRNA: *small interference RNA* (RNA pequeño de interferencia)

SLOS: *Smith-Lemli-Opitz syndrome* (síndrome de Smith-Lemli-Opitz)

SNC: Sistema nervios central

Sp1: *Specific protein 1* (proteína específica 1)

SRE: *Sterol response element* (elemento de respuesta a esteroides)

SREBP: *SRE-binding proteins* (proteínas de unión a SRE)

SRIF: *Somatotropin release-inhibiting factor* (factor inhibitorio de la liberación de somatotropina)

SSD: *Sterol sensing domain* (dominio sensible a esteroides)

sst: *Somatostatin receptor* (receptor de somatostatina)

TBS: *Tris buffer saline* (tampón Tris)

TCA: ácido tricloroacético

TEA: Trietanolamina

TESS: *Transcription element search system* (sistema de búsqueda de elementos de transcripción)

TIFFs: *Triton-X-100-insoluble floating fraction* (fracciones flotantes insolubles en Triton-X-100)

USF: *Upstream stimulatory factor* (factor estimulador río arriba)

UV: Ultravioleta

WB: *Western-Blot*

Summary/Resumen

Summary

Cholesterol is an essential component of plasma membranes and is involved in important processes in mammal cells, such as cell proliferation. Actually, cholesterol deficiency has been shown to arrest the cell cycle. In promyelocytic HL-60 cells, cholesterol starvation has been shown to induce differentiation into neutrophils. In the present work we studied the effects of cholesterol starvation on hormonally-induced differentiation of 3T3-L1 preadipocytes into mature adipocytes. We have found that treatment with different cholesterol biosynthesis inhibitors results in the reduction of lipid droplet formation and the inhibition of the expression of several transcription factors involved in adipogenesis (PPAR γ , C/EBP α and LXR α) as well as adiponectin and aP2, proteins that are characteristic of mature adipocytes. In order to elucidate the mechanisms involved, we firstly explored the clonal expansion, a process that is essential for the correct development of adipogenesis and precedes the expression of genes that regulate differentiation. We found that, once stimulated, 3T3-L1 cells underwent one round of cell division, independently they were treated with cholesterol biosynthesis inhibitors or not. Treatment with these inhibitors, however, resulted in the inhibition of both ERK1/2, p38 MAPK and Akt. The inhibition of ERK1/2 apparently was the most relevant for the cessation of the differentiation process, as it resulted in the inhibition of the phosphorylation of C/EBP β , a factor that governs the expression of several transcription factors involved in adipogenesis, which were found to be depressed by cholesterol biosynthesis inhibition. Therefore, the inhibition of C/EBP β phosphorylation appears to be the mechanism by which cholesterol starvation inhibits experimental adipogenesis.

Lipid rafts are cholesterol-rich membrane microdomains in which many receptors and acceptor molecules reside. Previous studies by others showed that membrane cholesterol extraction by means of cyclodextrins results in the destabilization of lipid rafts, and ultimately affecting both insulin-mediated signaling and 3T3-L1 differentiation. In our approach, inhibition of cholesterol biosynthesis resulted in a decrease of the cholesterol content in membranes, and the accumulation of different precholesterol sterols, depending on which enzyme was blocked. These changes in sterol composition resulted in the disruption of lipid rafts, with the loss of caveolin-1 and GM1 ganglioside, which ultimately affected the insulin-receptor signaling. This mechanism may be involved in the inhibition of adipogenesis produced by cholesterol starvation.

Haloperidol, a widely used antipsychotic, was reported to inhibit ergosterol synthesis in yeasts. We herein demonstrate that in mammal cells this drug inhibits different enzymes involved in cholesterol biosynthesis (Δ^7 -reductase > $\Delta^{8,7}$ -isomerase > Δ^{14} -reductase, in that order), as well as the egress of LDL-derived free cholesterol from the late endosome/lysosome compartment, thereby greatly affecting the intracellular cholesterol homeostasis. Based on these findings and considering that lipid rafts from neuronal cells have been shown to harbour both insulin and somatostatin receptors, we decided to study the effects of haloperidol in SH-SY5Y neuroblastoma cells *in vitro*. Treatment with this drug profoundly modified the sterol composition and disrupted lipid-raft structure, which was accompanied by the alteration of both insulin and somatostatin signalling. These effects may help in the understanding of the side effects that prolonged haloperidol treatment occasionally produces, which affect both motor activity and insulin sensitivity.

Previous studies in our laboratory showed that cholesterol deprivation results in cell cycle arrest at G2/M phase and that cholesterol provision rapidly induces the expression of cyclin B1 at both mRNA and protein levels. In the present work we sought to study the mechanism involved in this action of cholesterol. By using different constructions of the human cyclin-B1 promoter we found that the region conferring the ability to respond to cholesterol was near the start of transcription point. We then identified a new possible response element for the USF factor located 77 pb upstream the transcription start site in the cyclin B1 promoter, whose mutation abolished this response. This is the first time an element on a cyclin promoter is described with the potentiality to respond to changes in the intracellular cholesterol content.

Resumen

El colesterol es un componente esencial de las membranas de mamíferos y, además, está implicado en multitud de procesos celulares, entre ellos la proliferación. Su deficiencia impide la progresión del ciclo celular y, en determinados tipos celulares, como las células promielocíticas HL-60, esto conduce a su diferenciación hacia granulocitos. En el presente trabajo hemos estudiado el efecto de la deficiencia experimental de colesterol sobre la diferenciación de los preadipocitos 3T3-L1 a adipocitos inducida hormonalmente. Distintos inhibidores de la biosíntesis de colesterol produjeron una fuerte disminución de la acumulación de gotas lipídicas en esas células, efecto que estaba acompañado de una reducción de la expresión de diversos factores de transcripción implicados en el proceso de adipogénesis (PPAR γ , C/EBP α y LXR α) y de proteínas específicas de adipocitos maduros, como adiposina y aP2. Para establecer las causas, analizamos en primer lugar la fase de expansión clonal, que es esencial en este proceso y precede la expresión de genes que dirigen este programa de diferenciación. Observamos que las células 3T3-L1, una vez estimuladas, procedían a una división celular, proceso que no se vio afectado por la presencia de los inhibidores de la colesterogénesis. Examinamos a continuación determinadas vías de señalización implicadas en la diferenciación, observando que la inhibición de la biosíntesis de colesterol afectaba la fosforilación de las quinasas ERK1/2, p38 MAPK y Akt. Sin embargo, entre ellas, únicamente la vía de ERK1/2 parecía ser relevante para la continuidad de la diferenciación, en cuanto su inhibición se tradujo en una menor fosforilación del factor C/EBP β , requisito indispensable para que éste se una al DNA y active la expresión de sus genes diana, entre ellos algunos de los factores de transcripción cuya expresión hemos visto disminuida. La alteración de la vía de ERK1/2 y, en consecuencia, de la fosforilación de C/EBP β , por tanto, parece ser el mecanismo por el que la falta de colesterol bloquea la diferenciación de las células 3T3-L1 a adipocitos.

En los "lipid rafts", regiones de la membrana ricas en colesterol, se concentran multitud de moléculas de señalización. Otros autores demostraron que la desestructuración de estos microdominios por la extracción del colesterol de la membrana con ciclodextrinas, altera la señalización mediada por insulina así como la diferenciación de las células 3T3-L1. Nosotros estudiamos los efectos de distintos inhibidores de la colesterogénesis y observamos que todos ellos producían un descenso en los niveles de colesterol en estos microdominios, así como una acumulación de distintos intermediarios de la colesterogénesis, cambios que provocaban, a su vez, una deslocalización de los componentes característicos de los "lipid rafts", como la caveolina-1 y el gangliósido GM1. Esta desestructuración de los "lipid rafts" se acompañó de la pérdida de funcionalidad del receptor de insulina, inhibiéndose la señalización que desencadena. Puesto que la insulina es uno de los estímulos adipogénicos, proponemos que la alteración en la estructura y funcionalidad de los "lipid rafts" por la inhibición de la colesterogénesis, afecta las vías de señalización implicadas en la adipogénesis impidiendo, en consecuencia, la diferenciación de las células 3T3-L1 a adipocitos.

El haloperidol, un antipsicótico típico ampliamente utilizado, es una sustancia anfífilica de la que se conocía que inhibía la síntesis de ergosterol en levaduras. En el presente trabajo hemos demostrado que en células de mamífero, el haloperidol inhibe distintas enzimas de la biosíntesis del colesterol (Δ^7 -reductasa > $\Delta^{8,7}$ -isomerasa > Δ^{14} -reductasa, en este orden de actividad) y la salida del colesterol libre derivado de las LDL desde los lisosomas hacia el citoplasma, afectando gravemente la homeostasis intracelular del colesterol. Ante estos hallazgos y dada la presencia de receptores de insulina y de somatostatina en los "lipid rafts", decidimos estudiar sus efectos en células de neuroblastoma SH-SY5Y. El tratamiento con haloperidol alteró la formación de los "lipid rafts" y, consecuentemente, la señalización mediada por la insulina y por la somatostatina. Estos efectos pueden ayudar a comprender los efectos secundarios que, en ocasiones, el tratamiento prolongado con haloperidol produce en la actividad motora y la sensibilidad a la insulina.

Por último, hemos estudiado el efecto del colesterol sobre la expresión de la ciclina B1, proteína que modula la actividad de la Cdk1 y controla la transición entre las fases G2 y M en el ciclo celular. El análisis de la secuencia y de la actividad transcripcional del promotor completo y de distintas delecciones reveló la presencia de un posible elemento de respuesta a USF, localizado a -77 pb antes del inicio de la transcripción en el promotor de la ciclina B1, que parece ser el responsable de los cambios de actividad del promotor ante variaciones en los niveles celulares de colesterol, por cuanto su mutación anula esta respuesta. Esta es la primera vez que se describe un elemento en el promotor de una ciclina con potencialidad de responder al colesterol.

Introducción

Introducción

“Among de molecules of life, proteins and nucleic acids (DNA, RNA and genes) have by far received the major attention among scientist as well as the public during the second half of de 20th century. Owing to the tremendous focus on genomics and protein-based biological functioning, lipids and fatty acids have remained outside the mainstream of most areas of the life science. In many respects, lipids were becoming an overlooked class of molecules. The status of lipids is, however, in the process of changing. It is becoming clear that not all the answers to biological function can be derived from the genome. For example, it is not written in the genome how the molecular building blocks are assembled into macromolecular assemblies, organelles, and whole cells. Nor can one read in the genome how biological activity is regulated or how cells are molecularly organized” (Mouritsen and Zuckermann, 2004).

El colesterol se concibe popularmente como una sustancia perjudicial que obstruye las arterias y causa enfermedades vasculares. Si bien es cierto que alteraciones de su homeostasis que aumentan la concentración de colesterol LDL (*Light Density Lipoproteins*; lipoproteínas de baja densidad) en plasma son la causa de dolencias que afectan a un elevado sector de la población; la molécula de colesterol (5-colesten-3 β -ol) es también fundamental para el buen funcionamiento de muchos procesos celulares. Es componente esencial de las membranas de las células de mamíferos por ser el único lípido capaz de aportarles propiedades sin las cuales muchos procesos verían afectada su funcionalidad. Por sí mismo es precursor de moléculas tan importantes como las hormonas esteroídicas, reguladoras de multitud de procesos fisiológicos, y ácidos biliares, esenciales para la absorción y excreción de colesterol. Especialmente importante es su papel en el desarrollo y la diferenciación celular durante la embriogénesis como modulador de la señalización mediada por proteínas Hedgehog (Farese and Herz, 1998; Ingham, 2001). En el sistema nervioso es necesario para la diferenciación neuronal y la correcta transmisión en las sinapsis (Mauch et al., 2001; Pfrieger, 2003). Otra de sus implicaciones en la fisiología celular es su papel en proliferación (Brown and Goldstein, 1974; Chen et al., 1974). En este sentido es importante no sólo para generar nuevas membranas, sino como regulador del ciclo celular. A este respecto, nuestro grupo ha demostrado que el colesterol controla la progresión de la fase G2 a la fase de mitosis (Fernandez et al., 2005; Martinez-Botas et al., 1999).

Las células adquieren el colesterol necesario para el buen funcionamiento de todos estos procesos celulares de dos fuentes alternativas: la síntesis interna y la captación del colesterol circulante mediante el receptor de LDL.

1. Ruta de biosíntesis de colesterol-colesterogénesis

La colesterogénesis o síntesis de colesterol implica sucesivas reacciones enzimáticas por las que una molécula de 2 átomos de carbono (acetil CoA) pasa a escualeno, una molécula de 30 carbonos acíclica y apolar (Fig 1A). La producción del primer esteroide de la ruta, el lanosterol (30C), es catalizada por la escualeno ciclasa (Fig 1A). Éste se convierte en colesterol (27C) en el transcurso de 18 reacciones enzimáticas de reducción, desmetilación y cambios de posición de dobles enlaces (Fig 1B) (Yamauchi et al., 2007). Las enzimas que las catalizan se localizan en el retículo endoplásmico (RE), envuelta nuclear o gotas lipídicas, siendo la HMG-CoA (hidroximetilglutaril coenzima A) reductasa, que cataliza la producción de mevalonato, la enzima limitante de la colesterogénesis (Fig 1A). Esta enzima está sujeta a una regulación por esteroides, aunque también responde a muchos otros estímulos (Ikonen, 2006). Las reacciones que se suceden a partir del lanosterol pueden tener lugar a través de dos vías diferentes, la vía saturada (vía de Kandustch-Russell), en la que el precursor inmediato del colesterol es el 7-deshidrocolesterol (7-DHC) y la insaturada (vía de Bloch), cuyo último compuesto, el desmosterol, se transforma en colesterol gracias a la acción de la Δ^{24} -reductasa (Fig 1B) (Clayton, 1998). Esta enzima puede actuar sobre distintos intermediarios que contengan un doble enlace en el carbono 24 de la cadena lateral, conectando así ambas vías en distintos puntos a partir del lanosterol (Fig 1B). Además, presenta distinta afinidad por los sustratos, actuando preferentemente sobre el 5,7,24-colestratrien-3 β -ol, seguido del zimosterol, desmosterol y lanosterol (Fernandez et al., 2002).

Aparte de colesterol, a lo largo de la ruta se sintetizan intermediarios importantes en la biología celular, como los isoprenoides no esteroídicos, generados en reacciones anteriores a la producción de escualeno, de ellos derivan moléculas necesarias para la transcripción (isopentenil tRNAs), para la N-glicosilación (dolicol) y prenilación (farnesil y geranilgeraniol) de proteínas, y para el transporte electrónico mitocondrial (ubiquinona y hemo A) (Clayton, 1998; Ikonen, 2006) (Fig 1A). Cabe destacar también, la importancia del 7-DHC como precursor de la vitamina D (Fig 1B) (Herman, 2003).

1.1. Regulación de la homeostasis de colesterol. SREBPs

La homeostasis lipídica a través de los SREs (*Sterol Response Elements*) está controlada por una familia de factores de transcripción conocidos como SREBPs (*SRE-Binding Proteins*). Se han identificado tres miembros de la familia de los SREBPs: SREBP-1a, SREBP-1c y SREBP-2 (Hua et al., 1995; Yokoyama et al., 1993) que se sintetizan como precursores inactivos localizados en las membranas del RE. Aquí se encuentran formando un complejo con la proteína SCAP (*SREBP Cleavage Activating Protein*) (Sakai et al., 1997), que actúa como un sensor de colesterol a través de su SSD (*Sterol Sensing Domain*). El SSD de SCAP cambia su conformación cuando se une a colesterol u otros esteroides (Radhakrishnan et al., 2004). Este cambio conformacional le permite interactuar con proteínas Insig integrales del RE que retienen el complejo SCAP-SREBP en dicha localización (Yabe et al., 2002; Yang et al., 2002a). Cuando el contenido de colesterol disminuye, la interacción SCAP-Insig se debilita y el complejo SCAP-SREBP se libera y se dirige al Golgi (Espenshade et al., 2002). En este nuevo emplazamiento, SREBP sufre una proteólisis secuencial efectuada por dos proteínas del Golgi, S1P y S2P (*Site-1 protease* y *Site-2 protease*). Se libera, así, el extremo aminoterminal de SREBP, que es su forma activa. Este fragmento viaja al núcleo donde se unirá a elementos SRE (Horton et al., 2002) o E-box (Zeng et al., 2004) de las regiones promotoras y regulará la expresión de distintos genes. Entre estos genes se encuentran el receptor de LDL, enzimas de la síntesis de colesterol como la HMG-CoA sintasa, la HMG-CoA reductasa, mevalonato quinasa, escualeno sintasa, lanosterol 14 α -desmetilasa, etc. (Levine, 2004). También es capaz

de regular la expresión del transportador de colesterol ABCA1 (*ATP-binding cassette transporter A1*), aunque esta vez lo hace de manera negativa (Zeng et al., 2004). La retención de SREBP en el RE se consigue, de nuevo, una vez alcanzada una concentración suficiente de colesterol en la célula, y los niveles necesarios de Insig, cuyo gen también es diana de SREBP (Horton et al., 2003).

1.2. Desórdenes genéticos asociados a deficiencias en la síntesis de colesterol

Desde 1998 se han identificado varios desórdenes asociados a la deficiencia de enzimas que participan en la biosíntesis de colesterol después de la generación de escualeno: desmosterolosis, condrodisplasia punctata dominante asociada al cromosoma X (CDPX2), el síndrome CHILD (*Congenital Hemidysplasia with Ichthyosiform erythroderma or nevus and Limb Defects*), y la displasia esquelética HEM (*Hydrops-Ectopic calcification-Moth-eaten*) o de Greenberg. Todos ellos forman, junto con el síndrome de Smith-Lemli-Opitz (SLOS), un grupo de desórdenes que cursan con malformaciones inusuales en otros trastornos metabólicos. Tales anomalías son microcefalia, anormalidades en el esqueleto y retraso mental y del crecimiento. Además, en algunos de estos síndromes existe una probabilidad elevadísima de que los individuos no lleguen a nacer (Herman, 2003). Aunque su patogenia no está bien entendida, de la gravedad de sus síntomas se desprende la importancia del colesterol y sus derivados en el desarrollo embrionario.

Dentro de estos desórdenes, el primero en describirse fue el **SLOS**. Este síndrome es, con diferencia, el más común, con una incidencia aproximada de 1/40.000-1/50.000 en los Estados Unidos (Porter, 2000). Se describió en 1964 pero no fue hasta 1993 cuando Irons y colaboradores (Irons et al., 1993; Tint et al., 1994) detectaron en el plasma de varios pacientes una disminución en los niveles de colesterol y elevados niveles de 7DHC, lo que sugería una deficiencia enzimática de la Δ^7 -reductasa (Fig 1B). Los pacientes con SLOS presentan unos rasgos faciales característicos, retraso mental y del crecimiento, problemas en el desarrollo genital y alteraciones esqueléticas. Los individuos más gravemente afectados por este síndrome, con múltiples anormalidades congénitas y niveles de colesterol menores de 10 mg/dl, mueren en el periodo perinatal (Curry et al., 1987).

La descripción y estudio de otro de estos desórdenes, la **desmosterolosis**, es tremendamente complicado puesto que sólo se han identificado dos casos. Ambos pacientes presentaban rasgos faciales semejantes a los de pacientes con SLOS y elevados niveles de desmosterol en sus tejidos (Andersson et al., 2002; FitzPatrick et al., 1998). Además, en los dos casos, se detectaron unos niveles de desmosterol ligeramente aumentados en el plasma de los progenitores, sugiriendo que la desmosterolosis sería, entonces, una enfermedad hereditaria autosómica recesiva, provocada por una deficiencia en la Δ^{24} -reductasa (Fig 1B) (Andersson et al., 2002).

La **CDPX2** también conocida como síndrome de Happle o Conradi-Hunermann es una enfermedad rara ligada al cromosoma X que cursa con manifestaciones esqueléticas, oculares y dermatológicas y, presumiblemente, es letal en varones. En niñas, se define por la aparición de un eritema escamoso en el nacimiento que continúa durante toda la vida (Happle, 1993). La causa genética se identificó en 1999. Se observó una acumulación de 8-DHC (8-deshidrocolesterol) y 8-DHD (8-deshidrodesmosterol) en el plasma de estos individuos (Derry et al., 1999), lo que indica un defecto a nivel de la $\Delta^{8,7}$ -isomerasa (Fig 1B) (Kelley et al., 1999).

El **síndrome CHILD** es también una enfermedad ligada al cromosoma X, letal en varones. Los individuos afectados exhiben un fenotipo semejante al de la CDPX2 pero con una marcada distribución unilateral de las anomalías (Herman, 2000). Las lesiones escamosas unilaterales de la piel se presentan normalmente en el nacimiento, persisten durante toda la vida, y a menudo, afectan a grandes regiones de uno de los lados del cuerpo con una

delimitación muy marcada. Las malformaciones internas, entre las que se incluyen alteraciones renales, cardíacas y del sistema nervioso central sólo aparecen en el lado del cuerpo afectado por las lesiones dermatológicas. Algunos de estos pacientes, con diagnóstico dudoso, presentaban mutaciones en el gen de la $\Delta^{8,7}$ -isomerasa (Grange et al., 2000). Mientras que otros pacientes correctamente diagnosticados lo hacían en el gen que codifica para una esteroles deshidrogenasa o descarboxilasa que forma parte del complejo proteico de la C4-desmetilasa (Fig 1B). Estos pacientes acumulaban esteroides intermediarios con grupos metilos en el carbono 4 del anillo, siendo tales acumulaciones mucho menores que en los pacientes de SLOS y CDPX2 (Liu et al., 1999).

Como en el caso de la desmosterolosis, son escasos los individuos diagnosticados con **latosterolosis**. En 2002, se identificaron dos niños aquejados por esta enfermedad. Ambos, con fenotipo semejante al de los pacientes con SLOS, presentaban acumulación de latosterol en plasma o en fibroblastos en cultivo. En los fibroblastos procedentes de uno de los individuos, la actividad enzimática de la Δ^5 -desaturasa (Fig 1B) fue aproximadamente un 10% de la actividad normal (Herman, 2003).

La **displasia esquelética HEM** o displasia de Greenberg fue descrita en 1988 en un feto nacido muerto (Greenberg et al., 1988). Este desorden parece causar muerte prenatal de manera generalizada y, hasta el momento, se ha identificado en un total de 10 fetos aproximadamente, todos ellos caracterizados por edema fetal no inmune y un severo acortamiento de los miembros con una marcada desorganización ósea y cartilaginosa. En cartílagos de cuatro de estos fetos se detectaron elevados niveles de 8,14-colestadien-3 β -ol y 8,14,24-colestatrien-3 β -ol, sugiriendo un bloqueo de la síntesis de colesterol a nivel de la Δ^{14} -reductasa (Fig 1B) (Kelley, 2000).

Otro de estos desórdenes todavía no bien caracterizado parece ser el **síndrome de Antley-Bixler (ABS)**. En algunos de estos pacientes con la esterogénesis alterada, se observa un escaso desarrollo genital y un fenotipo similar al de niños expuestos a fluconazol durante el desarrollo uterino. El fluconazol es un antimicótico inhibidor de la lanosterol 14 α -desmetilasa. Por tanto, se ha propuesto la posibilidad de que algunos casos de ABS estén provocados por mutaciones en el gen que codifica para esta enzima (Aleck and Bartley, 1997). Finalmente, Kelley y colaboradores (Kelley et al., 2002) encontraron elevados niveles de lanosterol y dihidrolanosterol en linfoblastos de dos de estos pacientes con ambigüedad genital, hecho que confirmaría un defecto en la expresión o funcionalidad de la lanosterol 14 α -desmetilasa (Fig 1B). Sin embargo, en el gen de esta enzima no se encontraron mutaciones; hecho que apunta a posibles defectos en otras proteínas reguladoras de la reacción de desmetilación del carbono 14 todavía sin identificar.

1.3. Inhibidores de la colesterogénesis

1.3.1. Inhibidores de la HMG-CoA reductasa: Los más conocidos son las estatinas. La inhibición específica de la HMG-CoA reductasa (Fig 1A) mediante el uso de estatinas reduce la concentración de colesterol LDL en plasma. Este efecto ha establecido a estas sustancias como los fármacos por excelencia utilizados en tratamientos hipolipemiantes (Maron et al., 2000). Entre las utilizadas en clínica existen estatinas de primera generación procedentes de hongos (lovastatina y pravastatina); de segunda generación o semisintéticas (simvastatina) y de tercera generación o sintéticas (fluvastatina y atorvastatina). Las más potentes a la hora de reducir los niveles de colesterol son la atorvastatina y la simvastatina (Dujovne, 1997). También son efectivas para la reducción del colesterol celular en estudios *in vitro* (Martinez-Botas et al., 2001).

1.3.2. Inhibidores de la escualeno sintasa: En el año 1993 se aislaron tres metabolitos de cultivos de hongos (*Sporormiella intermedia* y *Leptodontium elatius*) que presentaban una potente acción inhibitoria de la escualeno sintasa (Bergstrom et al., 1993). Estos microorganismos se obtuvieron originalmente, de muestras procedentes del río Jalón (Zaragoza), por lo que adoptaron el nombre de ácidos zaragóxicos A, B y C. Su estructura química es muy semejante y se caracteriza por tener un núcleo común formado por el ácido 2,8-dioxobiciclo [3.2.1] octano-4,6,7-trihidroxi-3,4,5-tricarboxílico.

1.3.3. Inhibidores de la lanosterol 14 α -desmetilasa: El SKF 104976 [(3 β)-3-hidroxi lanosta-8,15-dieno-30-ácido carboxílico], es un ácido carboxílico de 32 carbonos derivado del lanosterol. Dentro de los inhibidores de la lanosterol 14 α -desmetilasa (Fig 1B), por su similitud estructural con el lanosterol, el SKF 104976 es uno de los más potentes y específicos (Mayer et al., 1991). Como otros derivados aminados de esteroides, el SKF 104976 presenta una alta toxicidad y no ha sido utilizado en humanos para combatir la hipercolesterolemia (Fernandez et al., 2005). En estudios *in vitro* se ha observado que provoca un bloqueo de la síntesis de colesterol y una acumulación de lanosterol y dihidrolanosterol (Fernandez et al., 2005; Martinez-Botas et al., 1999; Suarez et al., 2005).

1.3.4. Inhibidores de la esterol Δ^7 -reductasa: El AY 9944, ácido trans-1,4-bis (2-diclorobenzilaminoetil) ciclohexano dihidroclorido, mimetiza el defecto bioquímico que produce el SLOS (Keller et al., 2004), caracterizado por el déficit de la Δ^7 -reductasa. En ratas produce malformaciones teratógenas y alteraciones en los niveles de esteroides, disminuyendo el contenido de colesterol y aumentando el de 7-DHC (Tulenko et al., 2006). No es un inhibidor específico de esta enzima, puesto que según el tipo celular y la dosis utilizada es capaz de inhibir otras enzimas como la esterol $\Delta^{8,7}$ -isomerasa y la esterol Δ^{14} -reductasa (Fig 1B), produciendo acumulaciones de otros intermediarios (Fernandez et al., 2005; Tuck et al., 1991). Otro inhibidor de la Δ^7 -reductasa es el BM 17566 (Fig 1B). Al igual que el AY 9944 actúa como inhibidor competitivo de la enzima, pero, sin embargo, es un inhibidor específico (Aufenanger et al., 1986; Kraml et al., 1964)

1.3.5. Inhibidores de la esterol Δ^{24} -reductasa: El triparanol es el nombre por el que se conoce al compuesto 1-[p-(8-dietilaminoetoxi) fenil]-1-(p-tolil)-2-(p-clorofenil) etanol. Administrado en animales, reduce los niveles de colesterol tanto en plasma como en tejidos y aumenta los niveles de desmosterol, sin alterar el contenido total de esteroides (Avigan et al., 1960) sugiriendo una inhibición de la Δ^{24} -reductasa (Fig 1B).

El 5,22-colestadien-3 β -ol es un isómero inusual del desmosterol que presenta un doble enlace en el carbono 22 de la cadena lateral. Su fuerte efecto inhibitorio sobre la Δ^{24} -reductasa (Fig 1B) fue descrito por Fernández y colaboradores en nuestro laboratorio. Este compuesto es capaz de reducir la síntesis de colesterol hasta un 80% en dosis elevadas (3 μ g/ml) y aumenta la relación desmosterol/colesterol en células Caco-2 y HL-60 (Fernandez et al., 2002).

1.3.6. Otros inhibidores. El haloperidol: Este compuesto fue introducido en clínica para el tratamiento de las psicosis crónicas hace aproximadamente 40 años y su uso se ha extendido hasta nuestros días. Parece que ejerce su actividad antipsicótica, al menos en parte, a través de sus propiedades antagonistas sobre el receptor D2 dopaminérgico, (Miyamoto et al., 2005), sobre receptores σ_1 y σ_2 (Hashimoto and Ishiwata, 2006) y actúa con menor actividad, sobre receptores dopaminérgicos D1, D3 y D4, serotoninérgicos 2a y α_1 adrenérgicos (Miyamoto et al., 2005). Además, es un antipsicótico típico con capacidad de unión a la $\Delta^{8,7}$ -isomerasa de levaduras (ERG2) (Moebius et al., 1996) y a receptores σ_1 (Moebius et al., 1997). La estructura

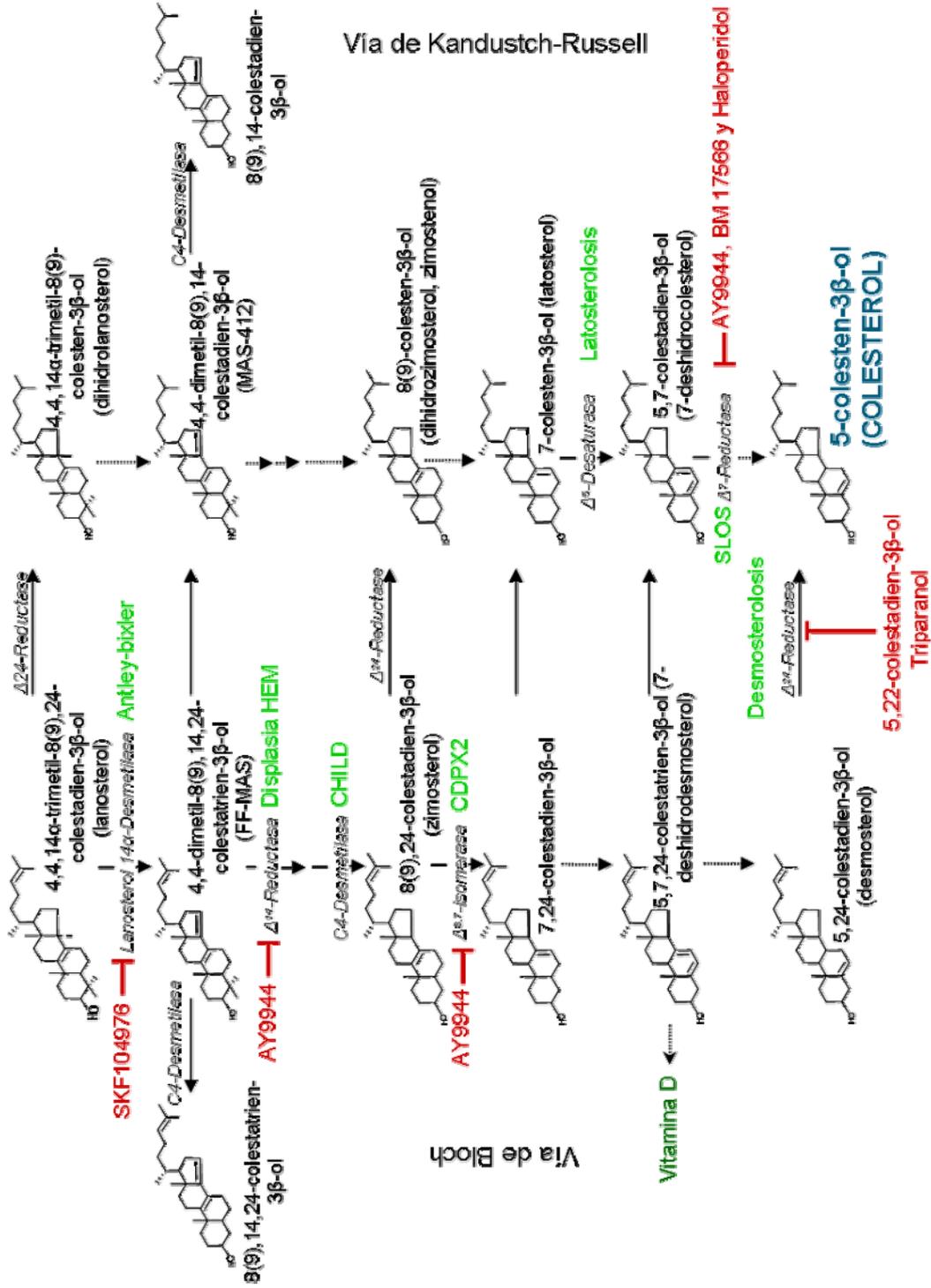


Figura 1B. Ruta de biosíntesis de colesterol de lanosterol a colesterol donde se indican la bifurcación de la ruta en la vía de Bloch y Kandustsch-Russell, los intermediarios sintetizados en las reacciones que tienen lugar, así como las enzimas encargadas de catalizarlas, los inhibidores que bloquean su actividad y las enfermedades relacionadas con sus deficiencias genéticas.

2. Microdominios de membrana. “Lipid rafts” y caveolas

La membrana plasmática es un componente celular generado por interacciones moleculares espontáneas de gran complejidad cuya estructura y función no viene determinada por el genoma celular (Mouritsen and Zuckermann, 2004). Esta interacción espontánea entre moléculas lipídicas determina la estructura básica de las membranas biológicas (Barenholz, 2002). Los componentes principales de las membranas celulares son los glicerofosfolípidos y, aunque son suficientes para formar bicapas, las membranas de células eucariotas contienen además esfingolípidos y esteroides (Fig 2) (Barenholz, 2002; Mouritsen and Zuckermann, 2004).

Los esfingolípidos, a diferencia de los glicerofosfolípidos presentan, normalmente, cadenas laterales saturadas y según su grupo hidrofílico son fosoesfingolípidos (siendo la esfingomielina el más abundante en células de mamíferos) o glicosfingolípidos (Fig 2), dentro de los cuales se encuentran los cerebrósidos y los gangliósidos. La esfingomielina representa el 10-12% de todos los lípidos de membrana, y aunque los glicosfingolípidos encarnan un bajo porcentaje (Degroote et al., 2004), en membranas especiales como la mielina alcanzan el 30% de los lípidos de la membrana (Stoffel and Bosio, 1997).

Los esteroides poseen una estructura rígida compuesta por 4 anillos y es el colesterol el mayoritario en vertebrados (Munro, 2003). Aunque sus niveles varían mucho según el tipo celular, normalmente constituye el 30-40% de los moles de los lípidos de la membrana plasmática (Lange et al., 1989; van Meer, 1989).

Dentro de la bicapa, los esfingolípidos suelen encontrarse en la cara externa mientras que la presencia de glicerofosfolípidos se limita a la cara interna. El colesterol se localiza en ambos lados interactuando preferentemente con esfingolípidos con cadenas laterales saturadas (Fig 2) (Munro, 2003; Ramstedt and Slotte, 2002).

En bicapas formadas exclusivamente por glicerofosfolípidos, las cadenas laterales presentan un alto grado de desorden que aporta gran fluidez a la membrana y movilidad lateral a sus componentes. Estas regiones reciben el nombre de “liquid-disordered phase” o fase fluída (Fig 2) (Mouritsen and Zuckermann, 2004; Silvius, 2003). Desde 1972, según el “Modelo de mosaico fluído” (Singer and Nicolson, 1972) las membranas biológicas se concebían como bicapas lipídicas en las que proteínas, colesterol, y otras moléculas permanecían inmersas entre los glicerofosfolípidos (Pike, 2003). A este respecto, en 1988 Kai Simons y Gerrit van Meer sugirieron una idea novedosa; como fue la presencia dentro de la membrana fluída, de microdominios enriquecidos en colesterol, glico- y fosoesfingolípidos, presentes en todas las membranas plasmáticas (Fig 2) (Simons and van Meer, 1988).

El colesterol altera profundamente la estructura de la fase fluída (Ohvo-Rekila et al., 2002; Yeagle, 1985). En zonas de la membrana con alto contenido en colesterol y esfingolípidos, el colesterol se dispone entre las cabezas hidrofílicas de los esfingolípidos con cadenas laterales saturadas, permitiendo un mayor empaquetamiento de estas cadenas y engrosando la membrana (Fig 2). Estas zonas forman una fase ordenada entre las regiones de la fase fluída (Fig 2) (Ipsen et al., 1987; Ipsen et al., 1989).

En la cara interna de la membrana el colesterol también funciona como espaciador disponiéndose entre las cadenas laterales de los esfingolípidos de estas regiones (Fig 2), que probablemente también contengan escasas insaturaciones en sus cadenas de ácidos grasos para favorecer el empaquetamiento (Simons and Ikonen, 1997; van Meer, 1989).

A pesar de aumentar el orden y reducir la permeabilidad de las membranas, en estos dominios se permite un alto grado de movilidad lateral de los componentes en el plano de la bicapa (Owicki and McConnell, 1980; Smith et al., 1980). Los esteroides sin grupos metilos orientados hacia la cara α de la molécula, son los responsables de aportar a estas zonas tales

particularidades. En mamíferos, el esteroil seleccionado para esta labor es el colesterol (Barenholz, 2002; Mouritsen and Zuckermann, 2004).

Estas regiones, ricas en colesterol y esfingolípidos que aportan orden a ciertas regiones de membrana se denominan “lipid rafts” o balsas lipídicas (Pike, 2003).

En el “*Keystone Symposium 2006 on Lipid Rafts and Cell Function*” se llegó a un consenso en cuanto a la definición de “lipid rafts” o balsas lipídicas: Los “rafts” de membrana son pequeños dominios heterogéneos (de entre 10 y 200 nm) altamente dinámicos, ricos en colesterol y esfingolípidos que compartimentalizan procesos celulares” (Hancock, 2006; Pike, 2006; Schmitz and Grandl, 2008).

Inicialmente fueron definidos por las propiedades que permiten su aislamiento como dominios de membrana resistentes a la extracción en Tritón X-100 frío al 1% que, debido a su baja densidad, flotan en la mitad superior de un gradiente de densidad de sacarosa del 5 al 30% (Pike, 2004). Según este criterio se les conoce como DRMs (*Detergent-Resistant Membrane*), DIGs (*Detergent-Insoluble, Glycosphingolipid-enriched membranes*) o TIFFs (*Triton-X-100-Insoluble Floating Fraction*) (Pike, 2003; Pike, 2004).

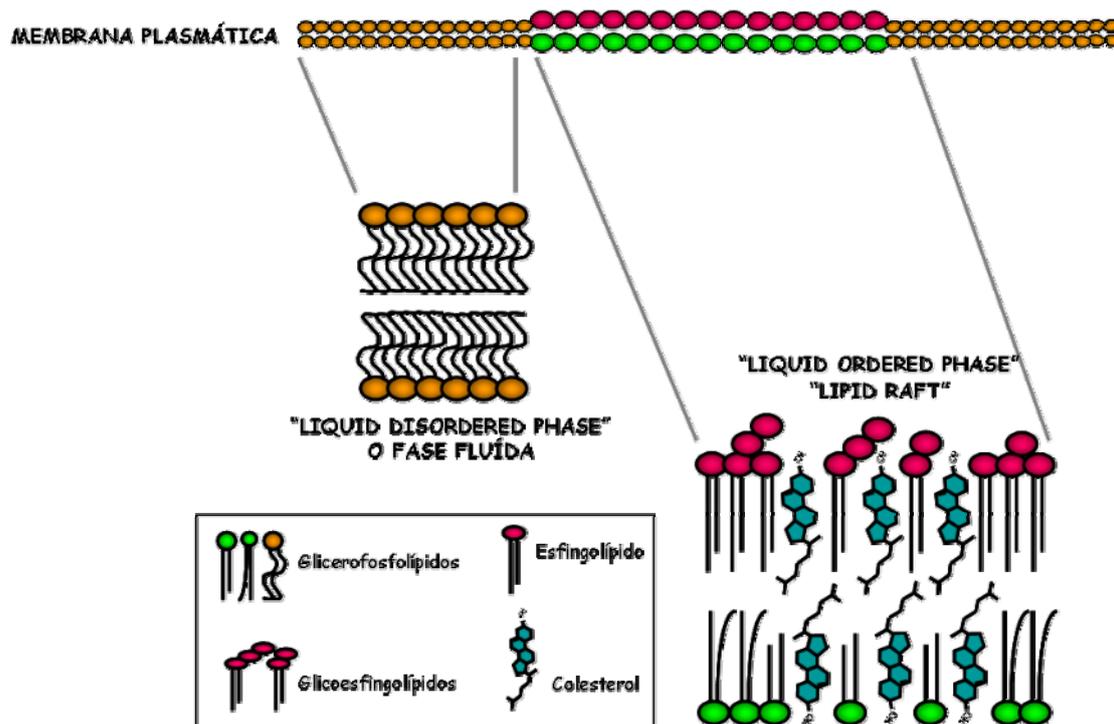


Figura 2. Esquema de las distintas fases que pueden encontrarse en las membranas plasmáticas. “Liquid disordered phase” o fase fluida y “Liquid ordered phase” correspondiente a las regiones de “lipid rafts”. Las representaciones de los distintos componentes se indican en el recuadro.

2.1. Caveolas

Son pequeñas invaginaciones de la membrana con un diámetro aproximado de 25-150 nm, que pueden existir como unidades independientes o formando grupos (Fig 3) (Pike, 2004; Thorn et al., 2003). Están presentes en mayor o menor medida en todos los tipos celulares pero son particularmente abundantes en células endoteliales, adipocitos, fibroblastos, células musculares lisas y pneumocitos tipo I (Bickel et al., 1997). Al igual que los “rafts” conservan altas cantidades de colesterol y esfingolípidos y presentan la peculiaridad de contener caveolina (Murata et al., 1995; Pike, 2003).

Tanto “lipid rafts” como caveolas son DRMs, se aíslan en las mismas fracciones de membrana y son prácticamente indistinguibles experimentalmente (Pike, 2004). Por ello, de ahora en adelante, se hará referencia a ambos indistintamente con el nombre de “lipid rafts”.

2.2. Composición lipídica

En los “lipid rafts” existe una mayor concentración de colesterol, glico- y fosfoesfingolípidos que en el resto de la membrana plasmática (Fig 3) pero sus proporciones en “rafts” respecto del total de la membrana plasmática varía según el tipo celular y el método utilizado en su aislamiento.

El contenido de colesterol de estos dominios (estimado como el 30-50% de todo el colesterol presente en membrana) (Pike, 2003) es 5 veces mayor que en el resto de la membrana plasmática (Gustavsson et al., 1999). Los fosfoesfingolípidos (concretamente, la esfingomielina) están un 15-30% más concentrados en “lipid rafts” y la concentración de glicoesfingolípidos (gangliósidos y sulfatidos) es 5 veces mayor que la que existe considerando la membrana completa (Pike, 2003; Prinetti et al., 2000). Un tipo especial de glicoesfingolípidos son los gangliósidos; presentan grandes cabezas polares y se disponen en la cara externa de la membrana (Fig 3) funcionando, a veces, como dianas de patógenos. Concretamente, el gangliósido GM1, localizado en “lipid rafts”, atrae a la subunidad B de la toxina colérica a la membrana, y la escolta hasta el retículo (Chinnapen et al., 2007; Degroote et al., 2004).

Igual que otras regiones de membrana, tienen estructura de bicapa con glico- y fosfoesfingolípidos en su cara externa, glicerofosfolípidos en la cara interna y colesterol en ambas (Fig 3) (Pike, 2004).

2.3. Composición proteica

2.3.1. Caveolinas: Familia de proteínas integrales de membrana de 20-24 kDa cuya presencia en “lipid rafts” produce invaginaciones de la membrana conocidas con el nombre de caveolas (Stan, 2005). Existen 3 isoformas, de las cuales caveolina-1 y 2 se expresan en la mayoría de tipos celulares, siendo la caveolina-1 más abundante en adipocitos, neumocitos, fibroblastos y células endoteliales. La caveolina-3 se presenta principalmente en células musculares (Schwencke et al., 2006). Estas proteínas presentan un dominio de unión a colesterol y un dominio de membrana en forma de horquilla, con el extremo carboxi y amino terminal orientados hacia el citoplasma (Fig 3) (Bickel, 2002). Se disponen en las caveolas formando filamentos concéntricos con otras proteínas y estabilizan la estructura de dichas invaginaciones (Stan, 2005). La caveolina-1 es esencial para la formación de caveolas y se caracterizó como el primer marcador molecular de estos dominios (Rothberg et al., 1992).

2.3.2. Flotilinas: Familia de proteínas de “lipid rafts” cuya localización específica en caveolas ha sido motivo de discusión. Aunque suelen presentarse en compañía de la caveolina, en los “lipid rafts” de cerebro sólo se detecta la presencia de flotilina, que representa un nuevo

marcador en los microdominios de estas regiones (Bickel et al., 1997). A pesar de que en otros estudios, esta proteína es indetectable en caveolas (Souto et al., 2003), todo parece indicar que las flotilinas se encuentran tanto en caveolas como en “lipid rafts” sin caveolina (Fig 3) (Bickel, 2002; Bickel et al., 1997). A diferencia de la caveolina, no tiene capacidad de unión a colesterol, sino que se dirigen y asocian a la membrana mediante palmitoilación y a través de su región N-terminal (Bickel et al., 1997; Browman et al., 2007).

2.3.3. Proteínas G: Reciben su nombre por la unión a nucleótidos de guanosina. Estas proteínas se presentan como trímeros con sus 3 subunidades (α , β y γ) localizadas en la cara interna de la membrana plasmática (Fig 3). Parecen estar presentes en “lipid rafts” por su interacción con la caveolina (Chun et al., 1994).

2.3.4. Familia Src: Son proteínas tirosina quinasa, como Fyn y Lyn, que funcionan como proteínas acopladoras en la transducción de señales. Se encuentran miristoiladas y palmitoiladas, hecho que determina su localización en “lipid rafts” (Fig 3) (Casey, 1995; Simons and Ikonen, 1997)

2.3.5. Proteínas transmembrana: Algunas proteínas con dominios transmembrana grandes sólo se localizan en “lipid rafts” por la imposibilidad de localizarse en otras zonas incapaces de aportar el grosor suficiente para albergar a estas proteínas (Degroote et al., 2004). Entre ellas, se encuentran gran número de receptores (Fig 3) como el receptor de insulina (RI) (Gustavsson et al., 1999) y receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) (Chini and Parenti, 2004).

2.3.6. Proteínas ancladas a GPI: Son proteínas unidas a glicosilfosfatidilinositol (*GPI-anchored proteins*) que se anclan a los “rafts” gracias a las dos cadenas de ácidos grasos, normalmente saturados, del fosfatidilinositol (Fig 3). Dentro de este grupo se engloban proteínas con funciones muy diferentes, involucradas en multitud de procesos celulares. Algunos ejemplos de proteínas ancladas a GPI son enzimas asociadas a la membrana plasmática como la fosfatasa alcalina, moléculas de adhesión, y proteínas implicadas en la presentación de antígenos (Brown and Rose, 1992).

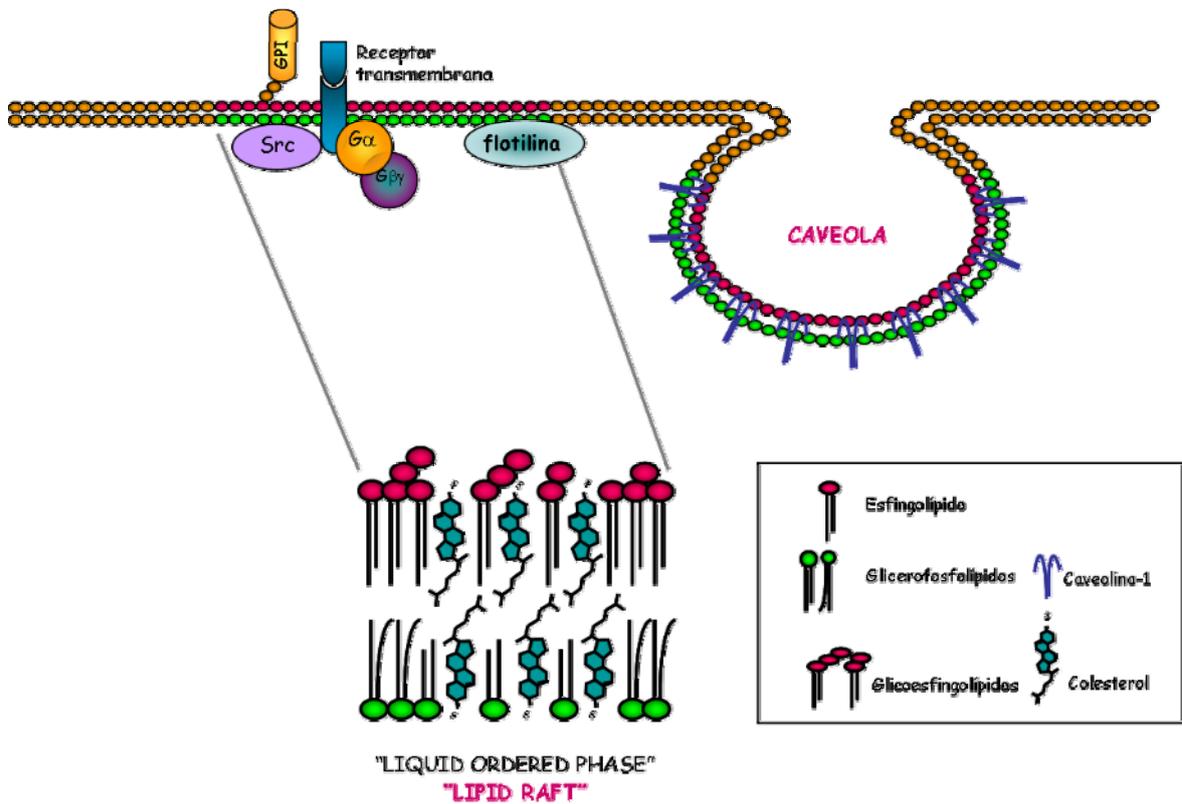


Figura 3. Esquema de "lipid rafts" y caveolas donde se indica de manera sencilla la composición lipídica y proteica de estos microdominios de membrana.

2.4. Métodos de aislamiento

Según el método de aislamiento utilizado se pueden obtener dominios de membrana que varían en su composición lipídica, pero comparten propiedades físicas. Juntos forman el heterogéneo conjunto de los "lipid rafts" (Pike, 2004)

2.4.1. Métodos con detergentes: Son los métodos aplicados tradicionalmente para el aislamiento de estos microdominios (Pike, 2003; Pike, 2004). De manera general, se emplea Tritón X-100 frío al 1% para homogeneizar las células. Los "rafts" se aíslan, por flotación, de las primeras fracciones de un gradiente continuo de densidad de sacarosa del 5 al 30% (Pike, 2003). Además de Tritón X-100 se ha empleado gran variedad de detergentes a distintas concentraciones y, de este modo, se han conseguido aislar dominios de membrana que varían en su composición lipídica (Schuck et al., 2003).

Existen problemas asociados al uso de detergentes para la extracción de "lipid rafts", ya que es posible que algunos de estos compuestos extraigan selectivamente poblaciones de proteínas o lípidos, proporcionando "rafts" cuya composición no se corresponde con la de los dominios presentes en la membrana original.

2.4.2. Métodos sin detergentes: Teniendo en cuenta los inconvenientes anteriores, se pretende un uso más generalizado de métodos sin detergentes para la obtención de los "lipid rafts" (Persaud-Sawin et al., 2008). Del mismo modo que en los métodos detergentes, el aislamiento de los "rafts" se consigue por flotación en un gradiente continuo de densidad de sacarosa del 5 al 30%, pero evitando el uso de tampones con compuestos detergentes

(Persaud-Sawin et al., 2008). Se basan en la fragmentación mecánica de las membranas como paso previo a su separación en gradiente de densidad. A tal efecto, se pueden aplicar métodos mecánicos, haciendo pasar el lisado varias veces a través de una aguja de un determinado grosor (Persaud-Sawin et al., 2008). Sin embargo, los métodos más conocidos y aplicados son los desarrollados por Song (Song et al., 1996) y Smart (Smart et al., 1995), que aplican la sonicación para fragmentar las membranas. El método de Smart se ha sugerido como el más adecuado para obtener unos "lipid rafts" altamente purificados, cuya composición es probablemente la más aproximada a la de los "rafts" presentes en células vivas (Pike, 2003; Pike, 2004).

2.5. Funciones

En un principio, la función atribuida a los lípidos de membrana fue la de servir como solventes para algunas proteínas (Singer and Nicolson, 1972). Sin embargo, las interacciones moleculares que ocurren en los "lipid rafts" son de gran relevancia para el buen funcionamiento celular.

Los "lipid rafts" se han implicado en multitud de procesos celulares. De este modo, se ha descrito su participación en el control de la adhesión y migración celular, en el establecimiento de las sinapsis, en la organización del citoesqueleto, y en la distribución y tráfico de proteínas en procesos de exo y endocitosis (Brown and London, 1998; Simons and Toomre, 2000). También intervienen en procesos patológicos, al ser las regiones de membrana por donde virus (Suomalainen, 2002), bacterias (Munro, 2003) y toxinas (Kovbasnjuk et al., 2001) atacan a las células. Además, son las zonas de membrana donde se localizan las placas de proteína amiloide en enfermedades priónicas (Naslavsky et al., 1997) y en la enfermedad de Alzheimer (Ehehalt et al., 2003)

Por otra parte, los "lipid rafts" funcionan como plataformas de señalización, donde se concentran gran parte de proteínas implicadas en dicho proceso. De hecho, estos microdominios propician una señalización rápida y eficaz al facilitar la interacción entre moléculas de una misma ruta de señalización (Incardona and Eaton, 2000; Simons and Ikonen, 1997). Esta eficacia se traduce en un aumento de la especificidad en la señalización, puesto que si la localización de un determinado receptor se restringe a una clase determinada de "lipid raft" se crea una compartimentalización de las rutas que impide respuestas inespecíficas (Simons and Ikonen, 1997). Parece que un "lipid raft" aislado contiene proteínas concretas, pero varios de estos microdominios pueden agruparse, facilitando interacciones entre moléculas que inician o amplifican la señalización (Janes et al., 1999). También se les ha atribuido un papel como moduladores de la actividad de determinadas proteínas; es el caso de algunos receptores tirosina quinasa, cuya actividad depende de su localización en "lipid rafts" (Pike, 2003).

3. Alteración del contenido de colesterol en membrana

La importancia fisiológica del colesterol en la membrana ha suscitado un gran interés durante los últimos años. Sus niveles se mantienen dentro de los valores que garantizan la integridad estructural de la membrana por el equilibrio establecido entre la captación de colesterol del exterior celular y la síntesis *de novo*. Muchas de las implicaciones de los "lipid rafts" en los procesos celulares se han descubierto alterando, de forma dirigida, estos niveles. Dichas variaciones conducen a cambios en su estructura y funciones. Especialmente importante es el hecho de que estas anomalías se hayan relacionado con el desarrollo de diversas patologías humanas, tales como cáncer, arterioesclerosis, enfermedad de Alzheimer e insulinorresistencia y diabetes (Schwencke et al., 2006). Los estudios sobre el efecto del

contenido de colesterol en la funcionalidad de los “lipid rafts” pueden desentrañar las causas y mecanismos de muchas de estas patologías y servir para emprender la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas (Zidovetzki and Levitan, 2007).

La mayoría de estudios dirigidos a la alteración en los niveles de colesterol en membrana se centran en la disminución del contenido de colesterol en “lipid rafts”. Este descenso se consigue mediante el uso de inhibidores de su síntesis aportados en un medio carente de colesterol o extrayendo el colesterol directamente de la membrana plasmática con el uso de ciclodextrinas (CDs) (Munro, 2003).

Las CDs son oligosacáridos cíclicos productos primarios de la degradación del almidón. A pesar de ser solubles en agua, contienen una cavidad capaz de albergar moléculas hidrofóbicas (Davis and Brewster, 2004). Las β CDs son las que presentan mayor afinidad por el colesterol y eficiencia en su extracción de las membranas (Ohtani et al., 1989). La metilación de estas moléculas aumenta significativamente su solubilidad en agua; así las metil- β CDs (β MCD) son las más utilizadas para disminuir el contenido de colesterol en la membrana plasmática (Zidovetzki and Levitan, 2007). Además de extraer colesterol, estas moléculas inducen cambios en las propiedades físicas de estos dominios (Zidovetzki and Levitan, 2007), provocan la desaparición de caveolas (Zidovetzki and Levitan, 2007) y deslocalizan varias proteínas de los “lipid rafts” (Kabouridis et al., 2000). Sin embargo, esto no significa que extraigan el colesterol exclusivamente de los “lipid rafts” y no de otras regiones de membrana. En este sentido, varios estudios apuntan a que las β MCDs extraen colesterol de ambas regiones, aunque lo hacen más eficazmente de los “lipid rafts” (Larbi et al., 2004).

A pesar de mostrar una mayor afinidad por el colesterol, las β MCDs también son capaces de extraer fosfolípidos de la membrana (Irie et al., 1992), y de interactuar con los dominios hidrofóbicos de algunas proteínas como la insulina (Aachmann et al., 2003).

La manera en que las CDs reducen el contenido de colesterol de la membrana plasmática no reproduce ningún mecanismo fisiológico por el que la célula sea capaz de conseguirlo por sí misma, sino que se utiliza como mera herramienta experimental. Por ello, y porque puede tener efectos sobre otros compartimentos de la membrana celular que no son específicos de “lipid rafts” (Bickel, 2002), es más adecuado reducir los niveles de colesterol modulando las enzimas de su ruta de síntesis, por ejemplo, con el uso de inhibidores específicos de estas enzimas (Fig 1A y B).

4. Efectos de la reducción del contenido de colesterol sobre la estructura, propiedades y funcionalidad de los “lipid rafts”

Se conoce que la acumulación de distintos intermediarios de la colesterogénesis, como la que ocurre en las deficiencias congénitas de diversas enzimas de la ruta de síntesis de colesterol, conduce a su incorporación a los “lipid rafts” alterando la estabilidad y propiedades de estos dominios (Megha et al., 2006).

Gran parte de los intermediarios esteroides que se forman en la biosíntesis de colesterol se transportan a la membrana plasmática y de ahí vuelven al RE para transformarse finalmente en colesterol (Yamauchi et al., 2007). Sin embargo, su capacidad para formar “lipid rafts” permanece en estudio.

4.1. Efectos sobre la estructura y propiedades. Modelos de membrana

Las propiedades de los distintos intermediarios de la ruta de síntesis del colesterol sobre la estabilización de los “lipid rafts” se han determinado mediante el uso de diversos modelos de membrana. En membranas artificiales, tanto intermediarios proximales de la síntesis de colesterol con un doble enlace en el carbono 8 (lanosterol, dihidrolanosterol,

zimosterol y zimostenol) (Fig 1B) (Megha et al., 2006) como su precursor inmediato, el desmosterol (Fig 1B y Fig 4) (que sólo se diferencia de él en el doble enlace del carbono 24) (Vainio et al., 2006) estabilizan débilmente la estructura de las balsas lipídicas. El desmosterol se localiza en las mismas regiones que el colesterol, pero su presencia en “lipid rafts” es tres veces menor (Vainio et al., 2006). A pesar de ser tan mal estabilizador de los “rafts” como los precursores proximales es posible que por su parecido estructural con el colesterol sea capaz de sustituirlo parcialmente en estos microdominios para compensar cambios en la composición de la membrana (Megha et al., 2006), pero no en la funcionalidad y actividad de algunas proteínas (Vainio et al., 2006)

Intermediarios como el latosterol y el 7-DHC con un doble enlace en el carbono 7 (Fig 1B) son más eficientes que el propio colesterol a la hora de formar estos dominios incorporándose a la membrana de manera más rápida que el colesterol (Megha et al., 2006). Sin embargo, a la hora de imprimir orden en determinadas zonas de membrana, es el colesterol el más eficaz de todos los esteroides de la ruta (Megha et al., 2006). Esto es debido a que consigue un mayor empaquetamiento de las cadenas saturadas de los esfingolípidos, seguido del 7-DHC. En este sentido, el desmosterol tiene menor capacidad para promover orden en la membrana (Vainio et al., 2006). De hecho, la sustitución del colesterol por cualquier otro intermediario perturba la presión lateral de la membrana, su grosor y, en consecuencia, el entorno donde residen los complejos de proteínas, que pueden desestabilizarse y ver afectada su actividad y funcionalidad (Samuli Ollila et al., 2007).

4.2. Efectos sobre la funcionalidad. Alteraciones de la señalización celular

La desestructuración de los “lipid rafts” por la reducción del contenido de colesterol afecta a la funcionalidad de diversas rutas de señalización (Bickel, 2002; Simons and Toomre, 2000) como se ha observado en modelos celulares tan dispares como linfocitos, que presentan “lipid rafts” sin caveolina (Kabouridis et al., 2000), o células endoteliales y adipocitos, con gran presencia de caveolas en sus membranas (Parpal et al., 2001; Ushio-Fukai et al., 2001).

El uso de estatinas provoca numerosos efectos pleiotrópicos que han sido atribuidos de manera generalizada a la alteración en la producción de grupos preniles. Sin embargo, se sabe que la disminución que provocan en los niveles de colesterol en plasma ocurre en paralelo a la disminución en los niveles de colesterol en las membranas celulares (Hillyard et al., 2007). Por ello, una idea alternativa sería atribuir la desestabilización de los microdominios de membrana a la reducción en los niveles de colesterol, lo cual causaría secundariamente la alteración de la señalización celular (Hillyard et al., 2007).

Uno de los efectos pleiotrópicos de las estatinas es la disminución de la respuesta inflamatoria mediada por células mononucleares, hecho que contribuye a la mejora de los procesos inflamatorios del endotelio vascular en situaciones de hipercolesterolemia. A este respecto, las estatinas (fluvastatina y simvastatina) provocan una desorganización de los “lipid rafts”, un bloqueo de la activación de ERK1/2 (*Extracellular signal-Regulated Kinase*) y p38 (p38 MAPK) (Hillyard et al., 2004), y una disminución de proteínas acopladoras, como Lyn (Hillyard et al., 2007). Puesto que inhibidores específicos de la producción de preniles no reproducen tales alteraciones, estos efectos se atribuyen a una disminución en los niveles de colesterol en membrana, más que a un descenso en la prenilación de determinadas proteínas (Hillyard et al., 2004; Hillyard et al., 2007). Además, la simvastatina también disminuye la actividad de la proteína Akt (*akr/Thymoma viral proto-oncogene protein*) localizada en “lipid rafts” (Zhuang et al., 2005).

El uso de inhibidores distales de la colesterogénesis que permiten la síntesis de preniles permite obviar la incertidumbre en la atribución del mecanismo de los efectos de las estatinas (Fig 1B). En este sentido, el AY 9944 (Fig 1B) provoca la deslocalización de

receptores NMDA (N-Metil-D-Aspartato) de “lipid rafts” en células neuronales disminuyendo significativamente la neurotoxicidad y muerte celular ante una sobreestimulación por glutamato (Ponce et al., 2008).

De la misma manera, el ácido zaragóxico A, inhibidor de la escualeno sintasa (Fig 1A), que bloquea la síntesis de esteroides sin afectar a la generación de prenilos, disminuye el contenido de colesterol en “lipid rafts” en un 60% sin afectar apenas el contenido de colesterol en otras regiones de membrana y afecta procesos celulares, como el crecimiento en células LNCaP (Brusselmans et al., 2007).

También existen estudios *in vivo* en los que se observan alteraciones en la funcionalidad de los “lipid rafts” por efecto de los intermediarios de la colesterogénesis. En ratas tratadas con AY 9944 (Fig 1B), el 7-DHC se incorpora a los “lipid rafts” más fácilmente que el colesterol, como ocurre en membranas artificiales, pero altera el contenido proteico de estos microdominios (Keller et al., 2004). En esta misma línea, en ratones knockout (KO) para la Δ^7 -reductasa, se observa una desorganización de los “lipid rafts” a pesar de la correcta incorporación del 7-DHC a la membrana y un desplazamiento de la proteína acopladora Lyn de “lipid rafts” a otras regiones de membrana (Kovarova et al., 2006).

Por su parte, el desmosterol también es capaz de sustituir al colesterol en la formación de membranas lipídicas (Huster et al., 2005). Sin embargo, en membranas celulares de mamíferos esta sustitución conduce a una alteración de la señalización localizada en los “rafts” de membrana (Jansen et al., 2008; Vainio et al., 2006). Del mismo modo, fibroblastos deficientes en la Δ^{24} -reductasa (Fig 1B), que acumulan desmosterol en membranas en vez de colesterol, ven desestabilizadas sus caveolas y alterada la señalización insulina-Akt-Bad implicada en apoptosis (Lu et al., 2006).

5. Señalización a través del receptor de insulina en “lipid rafts”. Importancia del colesterol

El receptor de insulina es un receptor transmembrana del tipo tirosina quinasa, formado por un heterotetrámero. Se compone de dos subunidades α y dos subunidades β . Las subunidades α son extracelulares y contienen los dominios de unión a insulina. Las subunidades β incluyen los dominios transmembrana e intracelulares y los dominios tirosina quinasa. La señalización por insulina está mediada por una red de proteínas bastante compleja que controla diversos procesos celulares (Jensen et al., 2008) (Fig 4). La unión de la insulina al receptor provoca un cambio conformacional del mismo que permite la autofosforilación en varios residuos de tirosina de la subunidad β y, en consecuencia, su activación (White and Kahn, 1994). A partir de este momento, ocurren una serie de fosforilaciones de proteínas con dominios SH2 (Pawson, 2004) o de unión a fosfotirosina (Katz et al., 2007). Entre estas proteínas se encuentra IRS (*Insulin Receptor Substrate*), que una vez fosforilada, transmite señales metabólicas a través de la fosforilación de PKB/ Akt (*Protein Kinase B/Akt*), que termina con la traslocación del transportador de glucosa GLUT4 (*Glucosa Transporter type 4*) a membrana, para la captación de glucosa; o mitogénicas a través de la fosforilación de las MAPKs (*Mitogen Activated Protein Kinases*), implicadas en procesos de crecimiento, supervivencia y diferenciación celular (Karlsson et al., 2004). Dentro de las MAPKs, la insulina puede activar p38 (Zarubin and Han, 2005), necesaria para la translocación de GLUT4 (Furtado et al., 2002), y ERK1/2, implicada en la regulación negativa de IRS-1 por fosforilación en residuos de serina (Taniguchi et al., 2006).

De manera generalizada, se acepta la localización del RI en “lipid rafts” (Fig 4), aunque existe controversia respecto a si se encuentra unido a caveolina-1 (Nystrom et al., 1999), o sólo se localiza en estas regiones de membrana ante la presencia de insulina (Karlsson et al.,

2004). Incluso se propone la fosforilación de la caveolina-1 por parte del RI (Kimura et al., 2002).

En cuanto a la alteración de esta señalización por la reducción de los niveles de colesterol en membrana, se sabe que el uso de MCDs reduce la producción de PI(3,4,5)P3 (fosfatidilinositol trifosfato) y PI(4,5)P2 (fosfatidilinositol bifosfato) (Fig 4) y la fosforilación de PKB/Akt pero no de ERK1/2 (Peres et al., 2003). En fibroblastos embrionarios de ratones KO para la Δ^{24} -reductasa, la deficiencia de colesterol desestructura las caveolas conduciendo a un desacoplamiento del RI de estas zonas y una menor fosforilación de sus sustratos, como Akt, induciendo apoptosis (Lu et al., 2006).

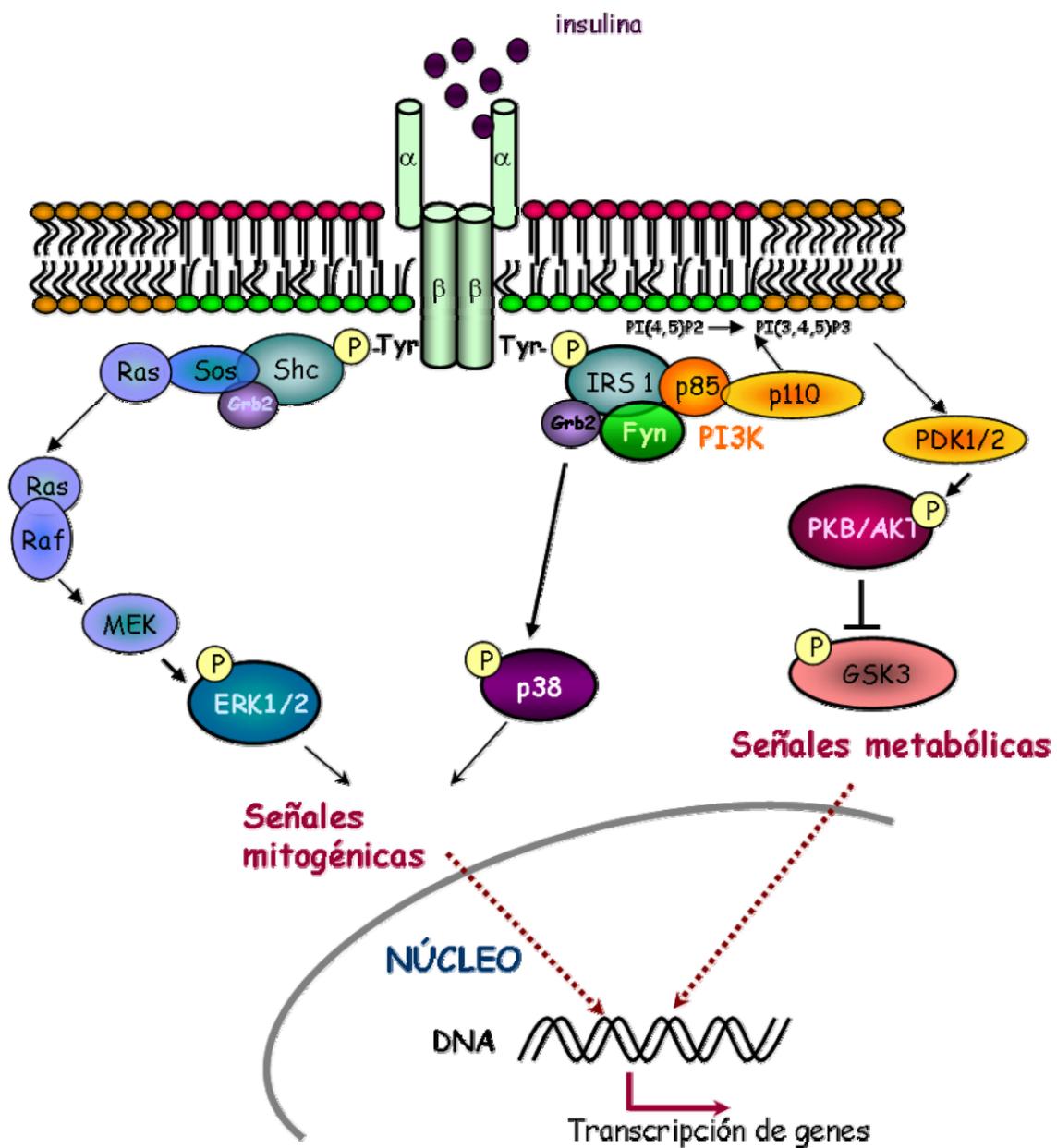


Figura 4. Esquema de la señalización mediada por insulina, donde se representan algunas de las proteínas implicadas y las interacciones entre ellas.

5.1. El receptor de insulina en adipocitos maduros

En adipocitos ya diferenciados se sabe que el RI presenta un dominio de unión a caveolina (Gustavsson et al., 1999). Según el grupo de Stralfors tanto en adipocitos 3T3-L1 como en adipocitos humanos primarios, el RI se une a la caveolina y se localiza en caveolas en ausencia de estimulación por insulina. Este grupo defiende la idea de que la señalización por insulina depende de la interacción de su receptor con la caveolina (Gustavsson et al., 1999; Karlsson et al., 2004; Parpal et al., 2001).

De hecho, en adipocitos, el uso de β MCD produce una casi completa desestructuración de las caveolas sin disminuir los niveles de caveolina (Parpal et al., 2001) y una inhibición de la activación de proteínas de la ruta como IRS-1 y PKB/Akt. Sin embargo, no afecta al número de receptores, ni a su actividad ni afinidad por la insulina. En cuanto a la actividad de ERK1/2 se han obtenido distintos resultados según el tipo celular. El descenso del contenido de colesterol en la membrana altera la señalización a través de esta proteína en adipocitos primarios humanos (Karlsson et al., 2004), pero no en adipocitos 3T3-L1 (Parpal et al., 2001). La reducción de los niveles de colesterol en membrana también disminuye la captación de glucosa por parte de estas células haciéndolas resistentes a la insulina (Gustavsson et al., 1999; Karlsson et al., 2004; Parpal et al., 2001). Por tanto, la funcionalidad de los RIs depende de su localización en caveolas. Tras el aporte de colesterol, se restaura tanto la estructura de las caveolas como la actividad de la vía, sugiriendo un papel clave del colesterol en este proceso (Gustavsson et al., 1999).

5.2. El receptor de insulina en cerebro

En el sistema nervioso central se detecta la presencia tanto de insulina como de su receptor (Havrankova et al., 1983). Ambos participan en la supervivencia neuronal inhibiendo la apoptosis, y en los procesos sinápticos implicados en el aprendizaje y la memoria (van der Heide et al., 2006). En muchas regiones cerebrales se detectan concentraciones elevadas del RI (Wozniak et al., 1993), que se expresa tanto en células gliales como en neuronas (Havrankova et al., 1983; Plum et al., 2005). En cerebro, el RI, una vez activado, es capaz de estimular la vía de PI3K/Akt (*Phosphatidil Inositol Triphosphate Kinase*, fosfatidilinositol trifosfato quinasa) (Fig 4), a través de la cual inhibe apoptosis y aumenta la supervivencia neuronal; y la vía de las MAPKs, relacionada con muerte celular (van der Heide et al., 2006).

En la membrana plasmática de células nerviosas es difícil detectar caveolina-1 (Ohira et al., 2000; Wu et al., 1997), pero sí existen unos dominios semejantes a las caveolas, en los que se localizan gran cantidad de proteínas tirosina quinasa y otras moléculas de señalización como proteínas G, PI3K, receptores tirosina quinasa como el RI y proteínas acopladoras como Fyn (Ohira et al., 2000; Wu et al., 1997). Muchas de estas proteínas tirosina quinasa una vez activadas, así como sus sustratos, se localizan en estos microdominios de membrana (Wu et al., 1997). Pero se sabe que su actividad quinasa no depende de esta localización, ya que pueden activarse también en otras regiones de la membrana plasmática (Ohira et al., 2000).

Existen ratones KO para el RI en cerebro (ratones NIRKO) muy útiles para el estudio de su papel en este órgano. En estos animales se observa una disminución en la fosforilación en tirosina de IRS-1, así como de la actividad de Akt, mientras que aumenta la actividad de GSK3 (*Glycogen Synthase Kinase 3*). Dicho aumento conduce a una mayor fosforilación de Tau (componente mayoritario de las lesiones neurofibrilares en Alzheimer) (Plum et al., 2005; Schubert et al., 2004). Sorprendentemente, estos ratones no sufren alteraciones en la memoria a largo plazo ni en el metabolismo de la glucosa en cerebro (Plum et al., 2005).

Existen evidencias de la alteración de esta vía en células nerviosas por reducción en los niveles de colesterol en membrana. Así, las CDs, disminuyen la actividad de IRS-1 y Akt en células PC12 (células de feocromocitoma de rata empleadas para el estudio de la diferenciación neuronal) y reducen la cantidad de caveolina en los "lipid rafts" de sus membranas (Lu et al., 2008). Esto sugiere la importancia de las caveolas y su contenido de colesterol para la funcionalidad de la señalización mediada por insulina en el cerebro.

Ciertos fármacos utilizados para el tratamiento de desórdenes nerviosos también provocan alteraciones de la señalización por insulina. Especialmente importante es el caso de los antipsicóticos. Estas sustancias, particularmente compuestos lipofílicos como el haloperidol (Fig 1B), están entre 20-100 veces más concentrados en cerebro que en plasma (Dai et al., 2007; Kornhuber et al., 2006). En tratamientos crónicos, el haloperidol puede llegar a producir daño cerebral y molecularmente reduce la fosforilación de Akt en cultivos de células neuronales (Dai et al., 2007; Ukai et al., 2004). Además, el tratamiento agudo de células neuronales PC12 con haloperidol inhibe la captación de glucosa (Dwyer et al., 1999).

6. Señalización a través del receptor de somatostatina. Importancia del colesterol

La somatostatina (SRIF, *Somatotropin Release-Inhibiting Factor*) (Moller et al., 2003) es un neuropéptido que regula la transmisión nerviosa en cerebro y la secreción hormonal en la pituitaria, páncreas, y células endocrinas del tracto intestinal. Existen dos formas fisiológicamente activas, la SRIF-14 y la SRIF-28. Estas moléculas median sus acciones por interacción con la familia de receptores de SRIF (Fig 5), constituida por seis subtipos (sst1, sst2A, sst2B, sst3, sst4 y sst5) codificados por 5 genes (Tulipano and Schulz, 2007). Estos receptores pertenecen a la superfamilia de los GPCRs (Tulipano and Schulz, 2007).

La interacción de los GPCRs con sus ligandos, provoca un intercambio de GDP (*Guanosin Di-Phosphate*) por GTP (*Guanosin Tri-Phosphate*) en la subunidad $G\alpha$ (Fig 5). Este hecho conduce a la disociación del complejo formado por las otras 2 subunidades, $G\beta\gamma$. A partir de este momento, la subunidad $G\alpha$ unida a GTP y el complejo $G\beta\gamma$ pueden ejercer su acción sobre distintos efectores (Fig 5). La hidrólisis del GTP a GDP desactiva la subunidad $G\alpha$, permitiendo, nuevamente, la reagrupación de las 3 subunidades (Mentlein et al., 2001).

Entre los efectores del sst se encuentra la adenilato ciclasa (AC) (Fig 5) (Tulipano and Schulz, 2007). La unión de SRIF a su receptor provoca la activación de proteínas $G\alpha_i$, que inhiben la actividad de la AC, disminuyendo la producción de AMPc (Watts and Neve, 2005) (Fig 5). Sin embargo, ante una prolongada estimulación de las proteínas $G\alpha_i$ por somatostatina, se produce una sensibilización de la AC que ahora será capaz de activarse por forskolina (FK) (Fig 5) o receptores acoplados a proteínas $G\alpha_s$ (Watts and Neve, 2005).

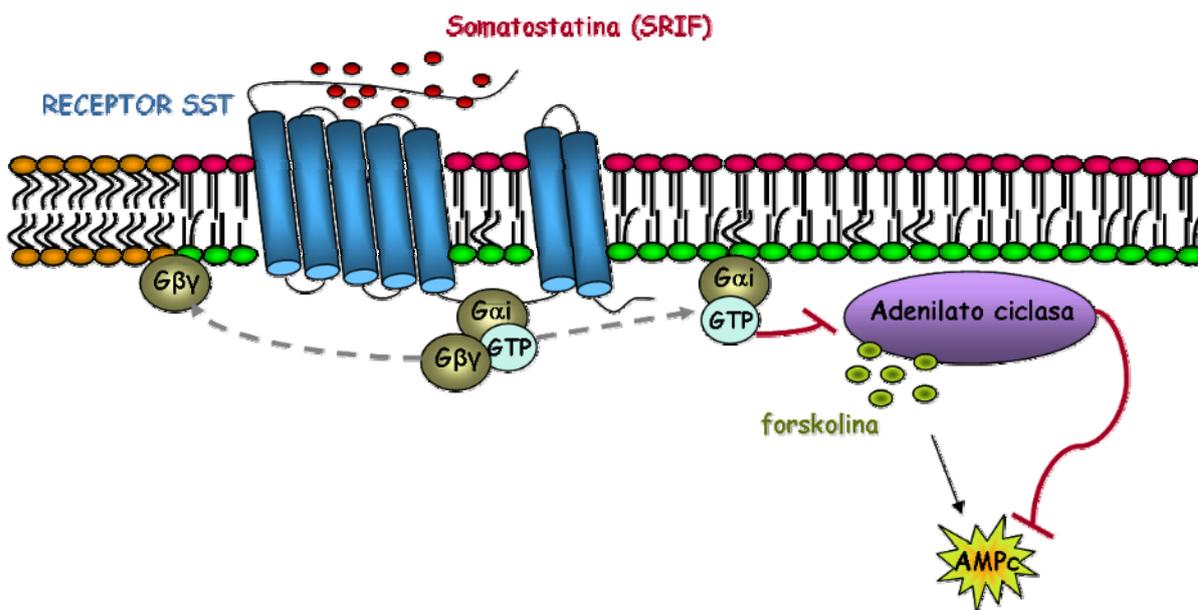


Figura 5. Esquema de la señalización mediada por SRIF donde se representan la funcionalidad de las proteínas G implicadas, así como el efecto de estímulos (forskolina) de la proteína efectora de la vía, la adenilato ciclasa.

Gran número de GPCRs se localiza en los “lipid rafts” (Chini and Parenti, 2004). Entre ellos se encuentra uno de los subtipos más abundantes del sst, el sst2 (Krisch et al., 1998), expresado en células de neuroblastoma SH-SY5Y (Hashemi et al., 2003). Aunque el mecanismo de unión de estos receptores a estos microdominios no se ha esclarecido todavía, se postula que el colesterol puede ser determinante para su localización (Chini and Parenti, 2004). También existe la posibilidad de que se dirijan a estas regiones por modificaciones lipídicas (Chini and Parenti, 2004; Moffett et al., 2000) o por interacciones con proteínas residentes en los “lipid rafts” como la caveolina-1 (Chini and Parenti, 2004).

Además de los GPCRs, también se localizan en “lipid rafts” algunas isoformas de la AC y proteínas Gα que modulan su actividad (Benarroch, 2007; Insel et al., 2005), como Gas y Gai unidas a la subunidad Gβγ (Donati and Rasenick, 2005). Existen autores que atribuyen un papel importante a la caveolina en la mediación de la señalización a través de proteínas G (Okamoto et al., 1998; Toki et al., 1999). De hecho, se propone que la caveolina interacciona con proteínas Gai2 (Song et al., 1996).

Existen evidencias de la alteración de la señalización mediada por AMPc ante una disminución del colesterol en membrana. La ruptura de los “lipid rafts” con βMCD deslocaliza muchas proteínas implicadas en dicha señalización (Donati and Rasenick, 2005), disminuyendo la actividad de la ruta de la AC tanto en cultivos de células PC12 (Cabrera-Poch et al., 2004) como en tejidos de cerebro y cerebelo (Yu et al., 2004). Asimismo, una desestructuración del citoesqueleto produce una disminución de la señalización por AC por deslocalización de la caveolina-1, proteínas Gas y de la AC de los “lipid rafts” (Head et al., 2006).

Estudios previos han relacionado el mecanismo de acción de los antipsicóticos con la señalización mediada por la adenilato ciclasa. Tratamientos crónicos con haloperidol provocan un gran aumento en los niveles de AMPc por aumento de la actividad de la AC (Dwivedi et al., 2002; Kaplan et al., 1999) pero también una disminución en la expresión de proteínas Gai y Gas en el estriatum de rata (Dwivedi et al., 2002; Gupta and Mishra, 1992; Shin et al., 1995). Otro efecto de antagonistas de receptores D2 dopaminérgicos, entre los que se encuentra el haloperidol, es el aumento de la actividad adenilato ciclasa estimulada por FK, aumentando

también los niveles de AMPc. En este caso, este efecto parece estar mediado por proteínas G α i y no por la estimulación de la adenilato ciclasa por G α s (Hall and Strange, 1997).

7. Adipogénesis

El tejido adiposo blanco se compone principalmente de adipocitos y constituye la mayor reserva energética en eucariotas superiores. Los adipocitos almacenan energía en forma de triglicéridos cuando el aporte nutricional excede el gasto de energía y liberan ácidos grasos en periodos de déficit energético (Fajas et al., 1998; Gregoire et al., 1998). Alteraciones de este equilibrio derivan en aumentos y reducciones del tejido adiposo, como ocurre en obesidad y lipodistrofias, respectivamente. El estilo de vida sedentario de los últimos tiempos y la difusión de dietas ricas en grasas han contribuido a un aumento significativo en la incidencia de la obesidad. De hecho, se calcula que entre el 25-30% de la población de países industrializados se encuentra aquejada por esta enfermedad (Bjorntorp, 1997; Rosenbaum et al., 1997) y en Estados Unidos se estima que un 65% de la población sufre sobrepeso, mientras que un 30% son obesos (Mokdad et al., 2001). El tejido adiposo, además de regular el flujo energético, altera los niveles de lípidos en plasma y las tasas de captación de glucosa (Otto and Lane, 2005). Por ello, la obesidad supone un factor de riesgo para el desarrollo de patologías como insulinoresistencia, diabetes mellitus no insulino dependiente, hipertensión y arteriosclerosis (Fajas et al., 1998; Gregoire et al., 1998).

Los adipocitos o células grasas proceden de células embrionarias con capacidad para diferenciarse hacia células de origen mesodérmico como adipocitos y miocitos (Fig 6) (Spiegelman et al., 1993). En la mayoría de las especies, los adipocitos del tejido adiposo blanco se forman en la vida embrionaria, pero su expansión ocurre inmediatamente después del nacimiento como resultado de un aumento del volumen celular (hipertrofia) (Fig 6) y el número de adipocitos (hiperplasia) (Gregoire et al., 1998). Esta hipertrofia e hiperplasia también ocurre en situaciones de obesidad severa en adultos (Belmonte et al., 2001), en las que los nuevos adipocitos formados en la etapa adulta proceden de la diferenciación de los preadipocitos existentes en el tejido adiposo (Hauner et al., 1989). Esta capacidad de formación de nuevos adipocitos, aun siendo más intensa en las primeras etapas, se mantiene durante toda la vida del individuo (Gregoire et al., 1998). A este respecto, la caracterización de los procesos moleculares que regulan esta diferenciación ha sido motivo de numerosas investigaciones durante los últimos 20 años.

Para el estudio de este proceso se cuenta con modelos celulares de líneas inmortalizadas de preadipocitos de ratón (Fajas et al., 1998). Las más utilizadas son las células 3T3-L1 y 3T3-F442A, ambas aisladas a partir de fibroblastos Swiss 3T3 procedentes de embriones de ratón de 17-19 días (Green and Kehinde, 1975; Green and Meuth, 1974).

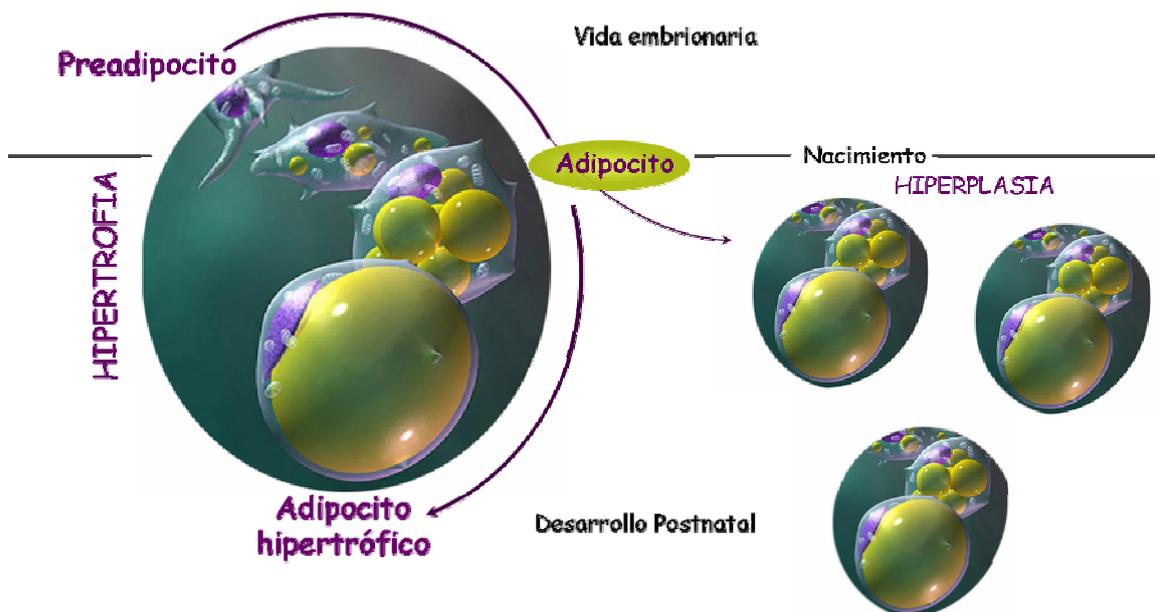


Figura 6. Representación esquemática de la formación de los adipocitos y de los procesos de hipertrofia e hiperplasia. Imágenes tomadas de www.gcarlson.com.

7.1. Factores de transcripción implicados en adipogénesis

Durante la diferenciación gran cantidad de moléculas transmiten al núcleo señales inhibitorias o inductoras procedentes del exterior celular. Aunque la mayoría de estas moléculas no se ha identificado todavía, existen factores de transcripción bien conocidos que establecen las directrices del proceso. Son factores de la familia de los C/EBPs (*CCAAT-Enhancer Binding Protein*) (C/EBP α , β y δ) y el PPAR γ (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor* γ) los de mayor peso en dirigir la adipogénesis, aunque también se cuenta con la participación del SREBP-1c y el LXR α (*Liver X Receptor* α) (Gregoire et al., 1998) (Fig 8).

7.1.1. C/EBPs: Esta familia de proteínas tiene la habilidad de formar homo y heterodímeros con otro miembro de la misma familia y unirse al DNA en la secuencia CCAAT contenida en las regiones promotoras de multitud de genes (Otto and Lane, 2005). De todos los miembros de esta familia de proteínas, sólo C/EBP α , β , δ y CHOP-10 (*C/EBP HOMologous Protein*) están implicadas en la adipogénesis. La expresión de genes en este proceso está finamente regulada por esta familia de proteínas, entre otras (Gregoire et al., 1998).

7.1.1.1. C/EBP β y δ : Son reguladores tempranos de la diferenciación de preadipocitos ya que su expresión máxima se detecta durante las primeras 4 horas desde el inicio del proceso (Otto and Lane, 2005; Tang and Lane, 1999). En fases más avanzadas de la adipogénesis, los niveles de C/EBP β disminuyen a la mitad y los de C/EBP δ son prácticamente indetectables (Cao et al., 1991). Estas proteínas se han propuesto como factores de vital importancia en la adipogénesis ya que la expresión ectópica de C/EBP β puede estimular la diferenciación en ausencia de otros estímulos externos (Yeh et al., 1995b), e inducir la expresión de PPAR γ 2 en presencia de sus ligandos. También son capaces de estimular la diferenciación de células NIH-3T3 (fibroblastos no preadipocitos) a adipocitos (Wu et al., 1996; Wu et al., 1995). Además, la expresión ectópica conjunta de C/EBP β y δ en células 3T3-L1 induce la expresión de C/EBP α y activa el programa adipogénico sin necesidad de estimulación hormonal (Farmer, 2006).

Tanto el AMPc (Gonzalez and Montminy, 1989) como la insulina (Klemm et al., 1998) provocan la fosforilación de CREB (*CRE Binding Protein*), que se une a los elementos de

respuesta a AMPc (*cAMP Response Elements*, CRE) del promotor de C/EBP β en los primeros minutos de la diferenciación de células 3T3-L1. Por su parte, la activación transcripcional de C/EBP δ se ve facilitada por la presencia de glucocorticoides y por el propio C/EBP β (Cao et al., 1991) (Fig 7).

A pesar de que su expresión alcanza los máximos niveles en estadios tempranos del programa, estos factores no adquieren la capacidad de unirse al DNA hasta las 16-18 horas de haber comenzado el proceso, coincidiendo con la entrada en la fase de expansión clonal (Tang et al., 2005). A tal efecto, existen varias quinasas que regulan la actividad de C/EBP β mediante fosforilaciones secuenciales. La primera, en la Thr188 por acción de una MAPK, ocurre en las primeras 4 horas de diferenciación y es necesaria para que tenga lugar la expansión clonal, para la unión de C/EBP β al DNA y para que se produzca la diferenciación terminal. Esta primera fosforilación no es suficiente pero sí necesaria para que C/EBP β pueda unirse al DNA (Piwien-Pilipuk et al., 2001; Tang et al., 2005). La segunda fosforilación, en Thr179 y Ser184 por acción de GSK-3 β ocurre después a las 12-16 horas de haber comenzado la diferenciación. Al igual que la fosforilación en Thr188, la segunda fosforilación es necesaria para que el C/EBP β adquiera, finalmente, la capacidad de unión al DNA. Además, coincide con el momento en que comienza la fase de expansión clonal y se activa la transcripción de C/EBP α y PPAR γ (Tang et al., 2005).

El papel esencial de estos factores de transcripción se deduce del estudio de la adipogénesis en ratones KO (Belmonte et al., 2001). MEFs (*Mouse Embryonic Fibroblast*) de ratones deficientes para C/EBP β son incapaces de consumir la expansión clonal y la diferenciación aun en presencia de estímulos adipogénicos. Esta situación se revierte tras inducir la expresión de C/EBP β en estas células (Tang et al., 2003). Parece pues, que C/EBP β es imprescindible para que la adipogénesis tenga lugar y es especialmente importante para el correcto desarrollo de la expansión clonal.

7.1.1.2. C/EBP α : Este factor es activado transcripcionalmente por C/EBP β y δ a través del elemento de respuesta a C/EBP de su promotor. Su expresión se mantiene a lo largo de todo el proceso mediante autoactivación (Timchenko et al., 1995). Niveles elevados de este factor durante las primeras etapas de la diferenciación impedirían la entrada de los preadipocitos en la fase de expansión clonal (Tang and Lane, 1999), pero existen mecanismos de represión que retrasan su expresión al momento adecuado del proceso, como la unión del factor nuclear CUP (*C/EBP Undifferentiated Protein*) a elementos de su promotor que reprimen la transcripción de C/EBP α , silenciando este gen hasta estadios más avanzados en el programa de diferenciación (Jiang and Lane, 2000).

La expresión ectópica de este factor en células 3T3-L1 induce su diferenciación a adipocitos en ausencia de cualquier otro estímulo (Lin and Lane, 1994). Por otra parte, una disminución de su expresión por el uso de siRNA (*small interference RNA*, RNA pequeño de interferencia) provoca el bloqueo de la adipogénesis (Lin and Lane, 1992). También se sabe que ratones KO para C/EBP α mueren prematuramente poco después del nacimiento debido a su incapacidad para producir glucosa (Farmer, 2006), lo que muestra su implicación en otros procesos.

Durante la diferenciación, C/EBP α estimula la transcripción de genes como aP2 (Tontonoz et al., 1994a; Tontonoz et al., 1994b), GLUT-4 (Kaestner et al., 1990), PEPCK (*Phospho-Enol Pyruvate Carboxikinase*) (Tontonoz et al., 1994b), leptina (Hwang et al., 1996) y RI (McKeon and Pham, 1991). Además, está implicado en la terminación de la fase de expansión clonal (Tao and Umek, 2000) y en el mantenimiento del fenotipo de adipocitos gracias a su autoactivación (Christy et al., 1991). De manera general se puede afirmar que C/EBP α es necesario y suficiente para inducir la adipogénesis.

7.1.1.3. CHOP-10: De entre los C/EBPs implicados en la adipogénesis, CHOP-10 es el único que presenta un dominio de unión a DNA no funcional, sin alteración de su capacidad para formar heterodímeros (Otto and Lane, 2005). Actúa como una isoforma negativa en el proceso de adipogénesis, puesto que los dímeros que forma con otros C/EBPs son dominantes negativos (Ron and Habener, 1992). De hecho, su expresión ectópica bloquea la diferenciación en células 3T3-L1 (Batchvarova et al., 1995). Se expresa en preadipocitos y en el momento oportuno de la diferenciación heterodimeriza con C/EBP β impidiendo su unión a DNA (Tang and Lane, 2000), hasta que las células han entrado en la fase de expansión clonal.

7.1.2. PPAR γ : Es un factor perteneciente a la superfamilia de receptores nucleares. El primer PPAR que se descubrió, PPAR α , se clonó como un receptor activado por clofibrato, fármaco con efecto hipolipemiante que inducía la proliferación de los peroxisomas en roedores (Issemann and Green, 1990). A pesar de recibir este nombre, otros miembros de la familia de los PPARs: PPAR γ y PPAR δ no inducen proliferación de peroxisomas (Francis et al., 2003). De manera general, tras su activación a través de ligando y dimerización con otro de estos receptores nucleares, los RXRs (*Retinoic X Receptor*) controlan la expresión de genes con elementos de respuesta PPREs (*PPAR Response Elements*) en su promotor (Tontonoz et al., 1995b).

Uno de estos PPARs, PPAR γ , fue descrito por Tontonoz y colaboradores como el factor clave para la adipogénesis (Tontonoz et al., 1994b; Tontonoz et al., 1994c). Esta proteína se expresa como dos isoformas, PPAR γ 1 y PPAR γ 2, generadas por el uso alternativo del promotor de un mismo gen, que da lugar a 4 mRNAs: los mRNAs *pparg1*, *pparg3* y *pparg4* codifican para la proteína PPAR γ 1, mientras que el mRNA *pparg2* codifica para la proteína PPAR γ 2 (Fajas et al., 1997; Tontonoz et al., 1994b). PPAR γ 1 se expresa en casi todos los tejidos, mientras PPAR γ 2 es la isoforma específica de adipocitos (Otto and Lane, 2005). Su expresión es suficiente para inducir el bloqueo de la proliferación (Altiok et al., 1997) e iniciar la adipogénesis y es esencial para el mantenimiento del fenotipo de adipocito completamente diferenciado (Hu et al., 1995; Tontonoz et al., 1995b).

La actividad transcripcional de esta proteína se modula por la unión de ligandos, modificaciones postranscripcionales o por interacción con otros receptores nucleares y cofactores. Los ligandos naturales de PPAR γ incluyen ácidos grasos y sus derivados, como la prostaglandina 15-deoxi-delta 12, 14-prostaglandina J₂ (Kliwer et al., 1995). Las tiazolidindionas, utilizadas como agentes antidiabéticos, son ligandos sintéticos de PPAR γ y como sus ligandos naturales, facilitan el proceso de adipogénesis (Lehmann et al., 1995). Esto junto con el hecho de que ratones deficientes para PPAR γ 2 sean resistentes a la insulina sugiere la implicación de este factor en la sensibilidad a dicha hormona y el metabolismo de la glucosa (Farmer, 2006).

Su actividad también puede ser modulada postranscripcionalmente mediante la fosforilación por MAPKs que conduce a su inactivación (Hu et al., 1996) o bien por su capacidad de unión al DNA, que viene determinada por la presencia de RXR (Fajas et al., 1998).

PPAR γ controla la expresión de varios genes necesarios en la fisiología del adipocito, como aP2/FABP4 (*Fatty Acid Binding Protein 4*) (Tontonoz et al., 1994a; Tontonoz et al., 1994b), LPL (Lipoproteína lipasa) (Schoonjans et al., 1995), acetil coenzima A sintasa (Schoonjans et al., 1995), sintasa de ácidos grasos (FAS; *Fatty Acid Synthase*) (Tontonoz et al., 1995b) y PEPCCK (Tontonoz et al., 1994b). Todas ellas implicadas en la coordinación de la captación y almacenamiento de ácidos grasos.

7.1.3. SREBP-1c: El SREBP-1c/ADD1 se identificó como el factor 1 para la determinación y diferenciación de adipocitos (*Adipocyte Determination and Differentiation-dependent factor 1*)

en ratas (Tontonoz et al., 1993) y como SREBP-1c en humanos (Yokoyama et al., 1993) de manera independiente. Ambas proteínas fueron caracterizadas como factores de transcripción implicados, respectivamente, en la diferenciación a adipocitos (Tontonoz et al., 1993) y en el control de la transcripción génica por colesterol (Otto and Lane, 2005). La insulina activa la producción de mRNA de SREBP-1c, cuyos niveles aumentan en las primeras 24 horas de diferenciación (Kim and Spiegelman, 1996). Es el responsable de activar la transcripción de genes implicados en el metabolismo del colesterol y en la captación y síntesis de ácidos grasos y triglicéridos (Kim and Spiegelman, 1996). Algunos de estos genes son la LPL (Kim and Spiegelman, 1996), la acetil CoA carboxilasa (Lopez et al., 1996) y FAS (Bennett et al., 1995). También activa la transcripción de PPAR γ (Kim et al., 1998) por interacción directa con elementos de respuesta en su promotor o por la producción de sus ligandos naturales (Fajas et al., 1999) mediante la activación de las enzimas encargadas de generarlos (Fajas et al., 1998).

7.1.4. LXR α : Factor perteneciente a la superfamilia de receptores nucleares y regulador del metabolismo del colesterol y los ácidos grasos. La familia de los LXR se compone de LXR α y LXR β (Seo et al., 2004). LXR α predomina en el tejido hepático, adiposo, renal y en el bazo mientras que la expresión de LXR β es ubicua (Lu et al., 2001). Los LXRs se activan por oxisteroles derivados del metabolismo del colesterol (Janowski et al., 1996; Schultz et al., 2000) y forman heterodímeros con el RXR. De esta forma se unen a elementos de respuesta conocidos como LXRE (*LXR Response Elements*) (Willy and Mangelsdorf, 1997). Funcionan como sensores de colesterol (Peet et al., 1998b) regulando la transcripción de genes implicados en la absorción, transporte y catabolismo del mismo (Lu et al., 2001; Peet et al., 1998a). En adipogénesis, la expresión de LXR α aumenta significativamente a partir del día 4 de diferenciación, mientras que la expresión de LXR β se detecta tanto en células en diferenciación como no diferenciadas (Juvet et al., 2003). Por tanto, es LXR α la isoforma implicada en adipogénesis (Fig 7). El bloqueo de su expresión mediante el uso de siRNA inhibe la adipogénesis y la expresión de PPAR γ y aP2 (Seo et al., 2004).

Tanto la insulina como aumentos en los niveles de AMPc provocan la activación de LXR α , que puede actuar directamente sobre las regiones promotoras de genes que codifican para proteínas implicadas en adipogénesis, como es el caso de PPAR γ y genes implicados en la lipogénesis (Narce and Poisson, 2004) o modulando la expresión de ADD1/SREBP-1c (Steffensen and Gustafsson, 2004) (Fig 7). De hecho, su activación a través del ligando sintético T0901317 aumenta, preferentemente, la expresión de genes lipogénicos como SREBP-1c (Repa et al., 2000), FAS, SCD (*Steatoril CoA Desaturase*) y acetil-CoA carboxilasa (Li and Glass, 2004) y de genes adipogénicos, como PPAR γ y aP2 tanto *in vivo* como *in vitro* (Narce and Poisson, 2004). Puesto que se ha descrito que tanto SREBP-1c, como PPAR γ y genes de la lipogénesis son diana de LXR α (Fig 7), puede considerarse que este factor participa en la diferenciación de adipocitos estimulando muchos y muy diversos procesos como la lipogénesis, la expresión de genes específicos de adipocitos a través de PPAR γ , y la formación de gotas lipídicas, a través de SREBP-1c (Seo et al., 2004).

7.1.5. Interacción entre distintos factores: Se propone que los dos primeros factores activados en la adipogénesis por acción de la insulina, el AMPc y los glucocorticoides son C/EBP β y δ (Fig 7). Ambos controlan simultáneamente la expresión de PPAR γ y C/EBP α (Fig 7). Como alternativa, es posible que el C/EBP β induzca la expresión de C/EBP α y juntos regulen la expresión de PPAR γ . Por otro lado, existen estudios que demuestran que la expresión ectópica de C/EBP β y δ induce la expresión de PPAR γ pero no de C/EBP α en ausencia de ligandos de PPAR γ (Farmer, 2006). De hecho, C/EBP β es incapaz de inducir la expresión de C/EBP α en MEFs deficientes de PPAR γ (Zuo et al., 2006). En resumen, es la

actividad conjunta de C/EBP β y δ la que facilita la expresión de PPAR γ (Fig 7) y éste junto con los dos C/EBPs anteriores, activa la expresión de C/EBP α (Farmer, 2006).

En ratones neonatos KO para C/EBP β y δ existen deficiencias en la generación de tejido adiposo, aunque expresan PPAR γ y C/EBP α . Esto indica que C/EBP β y δ intervienen en la adipogénesis en acontecimientos posteriores al aumento en la expresión de C/EBP α y PPAR γ . Tales eventos pueden incluir la producción de ligandos de PPAR γ (Hamm et al., 2001). Otro factor activado independientemente de los C/EBPs que también estaría actuando en este sentido es SREBP-1c, ya que estimula la producción de ligandos naturales de PPAR γ (Fig 7) (Kim et al., 1998).

Además de activar la producción de ligandos de PPAR γ , C/EBP β y C/EBP δ son capaces de activar su expresión (Wu et al., 1995). Una vez expresados, PPAR γ y C/EBP α se activan mutuamente para mantener definitivamente el fenotipo de adipocito diferenciado (Shao and Lazar, 1997) (Fig 7). MEFs de ratones KO para C/EBP α expresan niveles bajos de PPAR γ y ven reducida su capacidad para diferenciarse a adipocitos (Wu et al., 1999). La expresión ectópica de PPAR γ en estas células induce adipogénesis pero no las hace sensibles a la insulina (Wu et al., 1999). Sin embargo, la sobreexpresión de C/EBP α en fibroblastos PPAR γ (-/-) es incapaz de estimular la adipogénesis (Rosen et al., 2002). Por ello, parece que PPAR γ es el regulador central del proceso, siendo C/EBP α el único capaz de activar genes implicados en el desarrollo de la sensibilidad a insulina y en la inducción y mantenimiento de PPAR γ .

En cuanto a la interacción de LXR α con otros factores se sabe que no sólo PPAR γ estimula su expresión a través del PPRE localizado en su promotor (Chawla et al., 2001) sino que además, el gen de PPAR γ se ha establecido como una nueva diana de LXR α (Fig 7) (Seo et al., 2004) de manera que se establece un mecanismo de retroalimentación positiva que conserva la expresión de ambos para la ejecución del programa de adipogénesis. De hecho, parece que el aumento en la expresión de aP2 por LXR α ocurre a través de PPAR γ , ya que aP2 es diana de este último factor (Seo et al., 2004). A este respecto, la activación de la diferenciación por LXR α no ocurre en ausencia de PPAR γ , por tanto ambos factores estarían actuando a través de la misma vía de señalización con PPAR γ como efector final en el proceso (Fig 7) (Seo et al., 2004). Como hemos visto antes, LXR α también aumenta la expresión de SREBP-1c (Repa et al., 2000), que a su vez puede activar PPAR γ por interacción directa con su promotor o mediante la producción de sus ligandos naturales (Fajas et al., 1999).

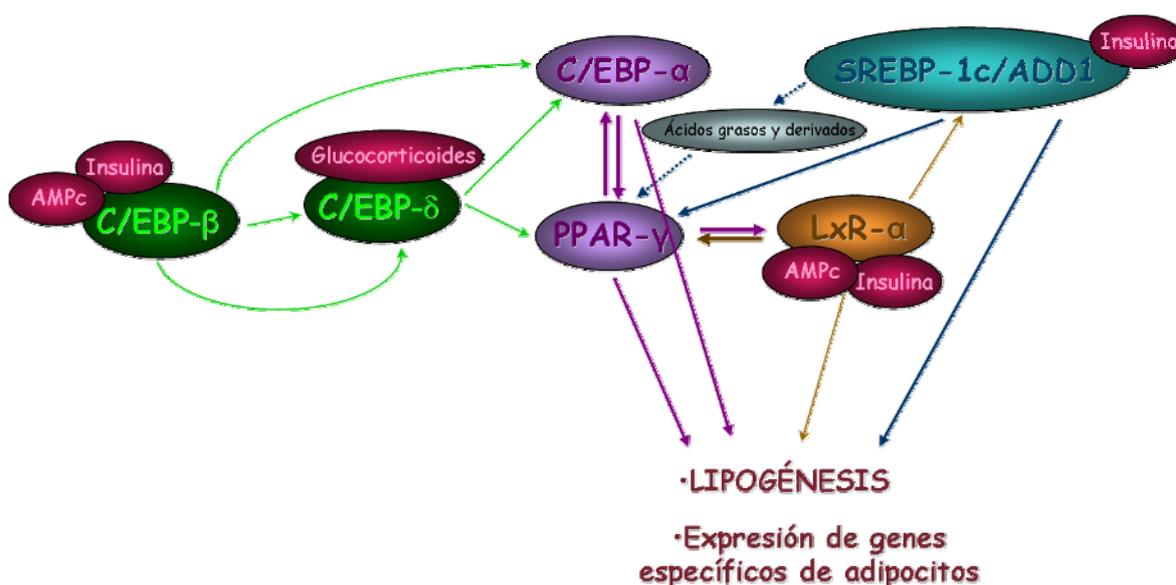


Figura 7. Esquema de las interacciones entre los distintos factores de transcripción implicados en la adipogénesis y los estímulos encargados de inducir su expresión.

7.2. Fases del proceso de diferenciación

Durante la adipogénesis, la adquisición del fenotipo de adipocitos ocurre en paralelo a cambios cronológicos en la expresión de numerosos genes (Gregoire et al., 1998). Mediante el empleo de la técnica de microarrays se estima que son unos 2.000 genes los que ven alterada su expresión a lo largo de todo el proceso (Guo and Liao, 2000). Estos genes se expresan de manera secuencial en fases tempranas, intermedias y tardías de la diferenciación (Gregoire et al., 1998).

7.2.1. Parada del crecimiento celular o inhibición por contacto: Este paso previo en el programa de la adipogénesis ocurre cuando los preadipocitos alcanzan la confluencia. Comúnmente, la parada del crecimiento celular y la inhibición por contacto se asumen como sinónimos pero que la inhibición por contacto sea el prerrequisito para que ocurra la diferenciación ha sido motivo de discusión. Collier y colaboradores demostraron que los cambios en la expresión génica provocados por la inhibición por contacto eran muy diferentes a los producidos por el bloqueo de la proliferación (Collier et al., 2006). En este sentido, un estudio reciente confirma que es el proceso de la inhibición por contacto por sí mismo y no la detención del crecimiento, el prerrequisito para que suceda la adipogénesis en células 3T3-L1 (Guo et al., 2009). Sin embargo, en otros modelos celulares este acontecimiento no parece ser crucial para que ocurra la diferenciación. De hecho, preadipocitos primarios de rata sembrados a baja densidad son capaces de diferenciarse a adipocitos sin haber alcanzado la confluencia (Gregoire et al., 1998).

Dos de los factores de transcripción anteriormente descritos, C/EBP α y PPAR γ , están implicados en el correcto desarrollo de esta etapa de la adipogénesis. Por un lado, el C/EBP α aumenta los niveles del inhibidor de Cdk's (*Cyclin dependent kinases*) p21 (Gregoire et al., 1998) y PPAR γ disminuye la unión a DNA y la actividad del factor de transcripción E2F (Altiok et al., 1997). Aunque ambos factores no ven aumentada su expresión hasta etapas más avanzadas del proceso, sus niveles de expresión en preadipocitos son suficientes para mediar la parada del crecimiento celular que precede a la diferenciación (Gregoire et al., 1998).

7.2.2. Expansión clonal: Después de la detención del crecimiento celular, y ante estímulos adecuados, los preadipocitos progresan hacia la siguiente etapa del proceso que consiste en sufrir al menos dos rondas de mitosis. En esta etapa, conocida como expansión clonal, parece que el DNA es más accesible para la activación transcripcional de genes necesaria para que prosiga la diferenciación. De hecho, el programa de expresión génica que conduce a la diferenciación terminal ocurre durante y al final de la expansión clonal (MacDougald and Lane, 1995). Aún está por determinar si este proceso es crítico para que las células puedan terminar la adipogénesis. Por una lado, varios estudios apuntan que la inhibición de la proliferación (Reichert and Eick, 1999; Yeh et al., 1995a) y de la síntesis de DNA (Kuri-Harcuch and Marsch-Moreno, 1983) en células 3T3-L1 impide su diferenciación a adipocitos. Sin embargo, preadipocitos primarios procedentes de tejido adiposo humano no necesitan experimentar estas rondas de mitosis para que prosiga la diferenciación (Aouadi et al., 2007).

7.2.3. Cambios en la expresión de genes tempranos: La expresión de C/EBP β y δ ocurre a las pocas horas de haberse inducido la diferenciación y sus niveles empiezan a disminuir en los primeros días de la adipogénesis (Cao et al., 1991; Tang and Lane, 1999) coincidiendo con un aumento en la expresión de C/EBP α poco antes de que se expresen los genes específicos de adipocitos (Gregoire et al., 1998; Mandrup and Lane, 1997).

Otro factor de transcripción inducido de manera temprana es el SREBP-1c. PPAR γ , a pesar de expresar sus máximos niveles en etapas más tardías de la diferenciación, es fácilmente detectable a partir del segundo día del proceso (Gregoire et al., 1998).

Es en esta etapa de la diferenciación donde ocurriría la interacción entre los diversos factores de transcripción descrita anteriormente.

7.2.4. Diferenciación terminal: Durante esta fase, la expresión y actividad de enzimas implicadas en el metabolismo de triglicéridos aumenta entre 10 y 100 veces (Gregoire et al., 1998). A su vez, la expresión de transportadores de glucosa y RI (García de Herreros and Birnbaum, 1989) aumenta durante las últimas fases de la diferenciación. Como resultado de tales aumentos en la expresión de estos genes, en esta última etapa aumenta la tasa de lipogénesis y la sensibilidad a la insulina de los nuevos adipocitos. Los niveles de PPAR γ y C/EBP α , que se mantienen elevados durante la diferenciación terminal, son los responsables de inducir la activación de genes implicados en el metabolismo de ácidos grasos, como SCD1 (Miller and Ntambi, 1996), PEPCCK (Tontonoz et al., 1995a), aP2 (Tontonoz et al., 1994a; Tontonoz et al., 1994b) y en el metabolismo energético, como GLUT4 (Kaestner et al., 1990) y leptina (Hwang et al., 1996).

7.3. Vías de señalización implicadas en adipogénesis

El hecho de que los estímulos adipogénicos activen de forma característica distintas vías de señalización plantea su posible implicación en el proceso. Tal es el caso de las vías de Akt y de las MAPKs.

7.3.1. Vía de PKB/Akt: La PKB/Akt es una serín/treonín quinasa activada por insulina que se expresa como 3 isoformas distintas: PKB α (Akt1), PKB β (Akt2) y PKB γ (Akt3) (Datta et al., 1999). Puesto que la diferenciación de preadipocitos 3T3-L1 es dependiente de insulina, se postula que Akt interviene en la transducción de su señal a proteínas efectoras (Kato et al., 2007; Xu and Liao, 2004). La inhibición de PI3K, activador de Akt, con wortmanina (Tomiyama et al., 1995) y el uso de siRNA para Akt1 (Xu and Liao, 2004) impiden la diferenciación de las células 3T3-L1 a adipocitos. En el mismo sentido, formas de Akt constitutivamente activas provocan la diferenciación espontánea a adipocitos en las células 3T3-L1 (Magun et al., 1996). En MEFs deficientes para Akt1, incapaces de convertirse en adipocitos, la expresión ectópica de esta isoforma conduce a la acumulación de gotas lípidas en estas células y a la expresión de genes específicos como *pparg* y *aP2*. Curiosamente, la capacidad adipogénica de MEFs deficientes para PKB β /Akt2 no difiere de la células normales (Peng et al., 2003). Todo esto sugiere que PKB α /Akt1 es la isoforma con mayor implicación en la diferenciación de las células a adipocitos (Baudry et al., 2006).

7.3.2. Vía de ERK MAPK: El papel de estas proteínas ha sido motivo de investigación en el proceso de adipogénesis por su posible implicación en la fase de expansión clonal además de por el hecho de que un estímulo adipogénico como la insulina, active la señalización que median (Bost et al., 2005a). La máxima actividad de esta quinasa se observa durante los primeros minutos de diferenciación (Huo et al., 2003), después decrece y vuelve a aumentar a las 12 horas. Esta segunda activación precede al momento en que los niveles de C/EBP α y PPAR γ alcanzan sus máximos niveles de expresión (Prusty et al., 2002).

Existen resultados contradictorios respecto al papel de ERK1/2 en adipogénesis. Por una parte, Sale y colaboradores, mediante el uso de oligonucleótidos antisentido contra ERK1 y ERK2, bloquearon la diferenciación de células 3T3-L1 en respuesta a insulina (Sale et al., 1995). Del mismo modo, inhibidores específicos de la vía de ERK como U0126 y PD98059,

redujeron significativamente la expresión de C/EBP α y PPAR γ sin afectar la de C/EBP β (Prusty et al., 2002). Por el contrario, se sabe que ERK1/2 tiene la capacidad de inhibir la adipogénesis mediante la fosforilación de PPAR γ inhibiendo su actividad (Camp and Tafuri, 1997; Hu et al., 1996). Estas observaciones aparentemente contradictorias tienen cabida en el mismo proceso si consideramos los cambios en la actividad de ERK en el tiempo. Su activación es tan necesaria en las primeras horas de la adipogénesis como su inactivación en el momento en que es imprescindible una actividad mantenida de PPAR γ para conservar el fenotipo de adipocito maduro. Según este modelo, estímulos como la insulina, activarían la vía de ERK durante las primeras etapas y, en consecuencia, la expansión clonal. De hecho, la inhibición de ERK durante esta fase bloquea eficazmente la adipogénesis (Tang et al., 2003).

Experimentos con inhibidores u oligonucleótidos antisentido no permiten discriminar entre los efectos de ERK1 o ERK2. Esto se hace posible en modelos celulares deficientes para cada una de las isoformas. En células deficientes de ERK1 no se afecta la proliferación, mientras que la inhibición de ERK2 en estas células sí bloqueó este proceso aunque no agravó los efectos de la ausencia de ERK1 en la adipogénesis. Por tanto, parece que es ERK1 la isoforma implicada en adipogénesis y ERK2 la necesaria para la proliferación celular (Bost et al., 2005b).

Teniendo en cuenta los resultados de estudios *in vitro* sobre el papel de ERK en adipogénesis, en ratones KO para estas proteínas cabe esperar alteraciones en el proceso de diferenciación. Mientras que los embriones de ratones KO para ERK2 son letales (Saba-EI-Leil et al., 2003), los ratones ERK1(-/-) son viables y fértiles (Pages et al., 1999). Estos animales presentan adiposidad reducida y están protegidos frente a la resistencia a insulina y a la obesidad inducida por una dieta rica en grasa (Aouadi et al., 2006a; Bost et al., 2005b). Además, la inhibición de la vía de ERK1/2 en células ERK1(-/-) no produce cambios en la adipogénesis, sugiriendo que ERK2 no participa en la diferenciación a adipocito (Bost et al., 2005b).

Se ha propuesto que el mecanismo molecular por el que ERK activa la adipogénesis y la expresión de C/EBP α es la fosforilación y activación de C/EBP β que le capacita para la activación transcripcional de sus genes diana (Hu et al., 2001; Trautwein et al., 1993). A este respecto, esta función ha sido atribuida típicamente a ERK1, aunque en algunos trabajos parece ser ERK2 la responsable de la fosforilación de C/EBP β (Hanlon et al., 2001).

7.3.3. Vía de p38 MAPK: La insulina estimula la actividad de esta quinasa en adipocitos (Sweeney et al., 1999) y, aunque existen contradicciones al respecto, parece ser necesaria en la adipogénesis. p38 regula la actividad de factores de transcripción implicados en adipogénesis como CHOP y C/EBP β , bien a través de otras quinasas o mediante fosforilación directa (Zarubin and Han, 2005). Se sabe que su activación provoca la diferenciación espontánea de preadipocitos (Engelman et al., 1999) y el uso de inhibidores selectivos de su actividad, como el SB203580, durante las fases más tempranas del proceso de diferenciación es suficiente para impedir la conversión de células 3T3-L1 a adipocitos (Engelman et al., 1998). Engelman y colaboradores atribuyen esta inhibición a la disminución en la fosforilación de C/EBP β . Además, demostraron que la sobreexpresión de una forma constitutivamente activa de MKK6 (quinasa que fosforila p38) es suficiente para inducir la diferenciación de células 3T3-L1 a adipocitos. Sin embargo, exposiciones prolongadas a esta construcción provocan la muerte de los adipocitos, demostrando que, igual que ERK, p38 puede tener diferentes efectos dependiendo del estadio de diferenciación en que se active (Engelman et al., 1999). En esta misma línea, su activación mediante BMP2 (*Bone Morphogenic Protein-2*) determina que las células mesenquimales pluripotentes C3H10T1/2 se diferencien hacia el linaje de células grasas. El uso de inhibidores de p38 en estas células, aun en presencia de BMP-2, reduce la formación de adipocitos así como la actividad de PPAR γ (Hata et al., 2003).

A p38 MAPK también se le han atribuido papeles negativos en la diferenciación. Tal es el caso de su implicación en la fosforilación y activación de CHOP, regulador negativo de la actividad de otros factores C/EBPs, que inhibe la adipogénesis (Batchvarova et al., 1995). Además, ejerce una actividad represora mediante la fosforilación de NFATc4 (*Nuclear Factor of Activated T-cells, cytoplasmic, Calcineurin-dependent 4*), que inhibe la diferenciación a adipocitos de células NIH3T3 (Yang et al., 2002b). Por otra parte, tanto con el uso de inhibidores de p38 (PD169316) como en células p38 (-/-) se observa un aumento de la diferenciación, que va acompañado de un aumento en la expresión de marcadores específicos de adipocitos y de factores de transcripción como C/EBP α y PPAR γ . Este efecto ha sido atribuido al aumento de los niveles de C/EBP β fosforilado (Aouadi et al., 2006b). Curiosamente, en trabajos posteriores, este mismo grupo observa un papel negativo del PD169316 sobre la adipogénesis en preadipocitos humanos de tejido adiposo subcutáneo y visceral. En este caso, el inhibidor produjo un descenso en los niveles de fosforilación de C/EBP β y en la expresión de PPAR γ (Aouadi et al., 2007). Según los autores, una posible explicación es que tanto en preadipocitos humanos, como en preadipocitos 3T3-L1, C/EBP β sea fosforilado directamente por p38; y el hecho de que en preadipocitos de ratón la inhibición de p38 aumente la fosforilación de C/EBP β sugiere la implicación de otras quinasas responsables de dicho efecto (Aouadi et al., 2007).

7.3.4. Vía de JNK MAPK: Existen tres isoformas conocidas de JNK: JNK1, 2 y 3. A pesar de que todas ellas son ubicuas, JNK3 se expresa preferentemente en cerebro. A estas quinasas se les han atribuido papeles negativos en la regulación de la adipogénesis. De hecho la activación de JNK fosforila PPAR γ impidiendo su activación (Camp et al., 1999). El fenotipo de ratones KO para JNK permite desvelar parte de su papel en el proceso de diferenciación que parece no ser tan negativo como se deduce de estudios en líneas celulares (Camp et al., 1999). De hecho ratones JNK1 (-/-) presentan una adiposidad reducida y son resistentes a la obesidad inducida por una dieta rica en grasa, así como una mayor sensibilidad a la insulina atribuida a la reducción de la fosforilación de IRS-1 en Ser307, que conduce a su inactivación (Hirosumi et al., 2002; Zick, 2001). Sin embargo, ratones KO para JNK2 (-/-) desarrollan obesidad ante una dieta rica en grasa (Aouadi et al., 2006a). De estas observaciones se desprende la idea de que ambas isoformas desempeñan papeles distintos en adipogénesis.

7.4. El receptor de insulina en preadipocitos y adipogénesis

Yang y colaboradores encontraron una relación entre la resistencia a la insulina y una alteración en la adipogénesis. En el tejido adiposo de individuos resistentes a la insulina observaron una reducción en la expresión de genes expresados durante la diferenciación terminal, como adiponectina y aP2 (Yang et al., 2004).

En preadipocitos, el RI se localiza tanto en caveolas como en regiones vecinas de membrana en ausencia del estímulo; pero parece que, en presencia de insulina, pasa a localizarse en caveolas de manera preferente (Huo et al., 2003). En estas células, el papel de la caveolina-1 en la activación del RI no está bien establecido. Se sabe que ratones KO para la caveolina sufren alteraciones en el proceso de adipogénesis, pero sólo en la etapa adulta (Huo et al., 2003). Se desconoce, por tanto, si la caveolina juega un papel vital en la activación de algunas proteínas de la vía o, simplemente, algunas de estas proteínas deben localizarse en los "lipid rafts" para que la señalización se produzca normalmente (Hong et al., 2004). Por otra parte, preadipocitos 3T3-L1 sin caveolina-1 ni caveolas pero sí con "lipid rafts" son capaces de diferenciarse a adipocitos ante estimulación hormonal. Además, la actividad de PKB/Akt y ERK1/2 se ve afectada tanto en preadipocitos normales como carentes de caveolina-1 (Hong et

al., 2004). Por tanto, es la presencia de “lipid rafts”, y no de caveolas, en la membrana de estas células el requisito imprescindible para una correcta señalización por insulina.

Existen datos de la alteración en la funcionalidad de esta vía durante la adipogénesis ante una disminución de los niveles de colesterol en membrana. El uso de agentes secuestrantes como las CDs, provoca una desestructuración de los “lipid rafts”/caveolas, inhibe la señalización a través del receptor IGF-1 sin afectar su activación y bloquea la diferenciación de células 3T3-L1 a adipocitos (Huo et al., 2003). En cuanto a la alteración de las vías de transducción de señales, la extracción del colesterol de membrana con el uso de β MCD inhibe la señalización a través de ERK1/2 y PKB/Akt en células 3T3-L1 aún indiferenciadas y su diferenciación a adipocitos por bloqueo de la fase de expansión clonal (Huo et al., 2003).

7.5. Inhibición de la biosíntesis de colesterol y adipogénesis

La mayoría de trabajos dirigidos al estudio de los efectos de la inhibición de la síntesis de colesterol sobre el proceso de adipogénesis se han realizado con estatinas. La exposición a atorvastatina de preadipocitos en diferenciación reduce dramáticamente la acumulación de lípidos, la expresión de CEBP β , inhibe la actividad de Akt y disminuye en gran medida la captación de glucosa en respuesta a insulina en adipocitos ya completamente diferenciados (Mauser et al., 2007). Estudios en células estromales de médula ósea muestran que la simvastatina induce su diferenciación hacia osteoblastos e inhibe la diferenciación a adipocitos aun ante la estimulación de la adipogénesis (Song et al., 2003). Por otra parte, existen estudios en los que los efectos de las estatinas inducen la formación de adipocitos más sensibles a insulina y leptina por activación de SREBP-1c (Erol, 2005) y aumentan la expresión de LPL en células 3T3-L1 (Bey et al., 2002). El uso de inhibidores de pasos tempranos de la colesterologénesis puede complicar la atribución de los efectos que provocan solamente a la ausencia de colesterol, ya que, a ello se suma la ausencia de muchos otros intermediarios necesarios para diversos procesos. En uno de sus trabajos, Nishio y colaboradores concluyeron que la inhibición de la diferenciación de células 3T3-L1 por estatinas se debe más a un déficit de isoprenoides derivados del mevalonato, que a la ausencia de colesterol (Nishio et al., 1996). Sin embargo, estudios más recientes apuntan que las estatinas inhiben la diferenciación a adipocitos por inhibición de la expresión de PPAR γ (Li et al., 2003; Nakata et al., 2006; Nicholson et al., 2007). De hecho, la administración de estatinas en estadios finales de la adipogénesis también inhibe la diferenciación a adipocitos de las células 3T3-L1, por tanto, el colesterol no sólo sería imprescindible para la inducción, sino también para el mantenimiento y culminación del proceso (Tomiyama et al., 1999).

8. El ciclo celular

La progresión del ciclo celular está rigurosamente controlada por complejos formados por dos tipos de proteínas: las Cdks, que constituyen la unidad catalítica del complejo, y las ciclinas (Fig 8), determinantes de la actividad de las anteriores y cuya expresión está sujeta a una fuerte regulación (Grana and Reddy, 1995; Trembley et al., 1994). La activación del complejo característico de cada fase del ciclo celular determina el paso a través de ella (Fig 8) (Cheung et al., 1999; Pines, 1995).

El transcurso de G2 a mitosis está regulado por la Cdk1 (p34 o Cdc2) (Ito, 2000; Lew and Kornbluth, 1996), cuya activación catalítica depende de la presencia de suficiente ciclina B1 (Pines and Hunter, 1990; Solomon et al., 1990). La expresión de la ciclina B1 comienza a aumentar durante la fase de síntesis de DNA (fase S) y alcanza los niveles máximos de expresión en G2/M; estos niveles descienden hasta desaparecer en el paso de metafase a anafase durante la mitosis (Fig 8) (Bai et al., 1994; Piaggio et al., 1995). La correcta expresión

de ciclina B1 en G2 es crítica para determinar la entrada en mitosis, así alteraciones de la misma conducen a una desregulación del ciclo celular y un crecimiento descontrolado de la célula (Buckley et al., 1993; Gong et al., 1994; Ito, 2000).

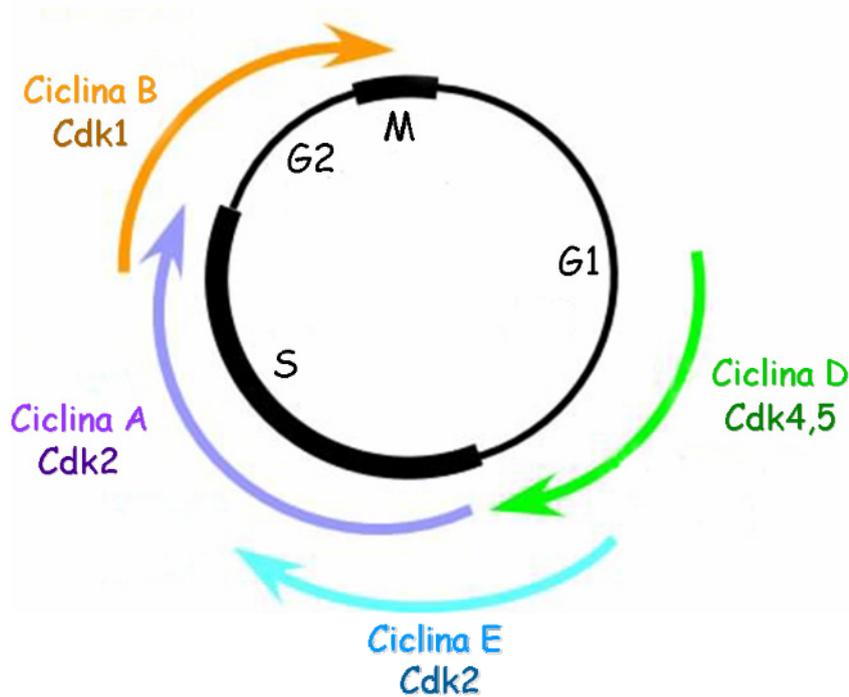


Figura 8. Esquema del ciclo celular en el que se indican las distintas fases del mismo, así como los complejos Cdk-Ciclina encargados de dirigir el paso de unas a otras. M, mitosis; G1, Gap1; S, síntesis; G2, Gap2; Cdk, *cyclin dependent kinases*, quinasa dependiente de ciclinas. Tomado de www-rcf.usc.edu.

8.1. Importancia del colesterol en el ciclo celular

El colesterol es necesario tanto para el crecimiento como para la proliferación celular (Brown and Goldstein, 1974; Chen, 1975 #51), pero si su importancia en estos procesos se debe al requerimiento para formar membranas celulares o a que ejerce un posible papel regulador está aún por determinar.

En situaciones en las que disminuyen los niveles de colesterol en la célula, se altera el ciclo celular. La lovastatina utilizada a concentraciones relativamente bajas, que no menoscaban la prenilación de proteínas, bloquea principalmente el ciclo celular en G2/M. Además, este efecto es revertido añadiendo colesterol al medio. A concentraciones más elevadas, que inhiben la prenilación de proteínas, las células se acumulan en G1, efecto que es revertido por mevalonato, (Martinez-Botas et al., 2001). Otros inhibidores distales de la colesterologénesis que bloquean la ruta después de que se generen los isoprenoides (ácido zaragóxico A, SKF 104976, SR 31747, BM 15766, y AY 9944) bloquean, igualmente, el ciclo celular en G2/M (Fernandez et al., 2005). Estos resultados demuestran que el bloqueo del ciclo celular en el paso entre G2 y mitosis se debe a la inhibición de la síntesis de colesterol y no a la ausencia de grupos prenilos. Uno de estos inhibidores distales, el SKF 104976 (inhibidor de la lanosterol 14 α -desmetilasa), además de producir un bloqueo del ciclo celular en G2/M, provoca un descenso en la actividad de la Cdk1, cuya actividad está regulada por la ciclina B1 (Martinez-Botas et al., 1999; Suarez et al., 2005). Puesto que el colesterol evita y revierte los efectos del SKF 104976, la parada en G2 se debe a un descenso en los niveles de colesterol, molécula que debe jugar algún papel como regulador del ciclo celular. Además, se propone que

el mecanismo por el cual el colesterol ejerce esta regulación sobre la actividad de la Cdk1 está relacionado con cambios en los niveles de proteína de la ciclina B1, ya que en presencia de SKF 104976, el colesterol es capaz de aumentar los niveles de esta proteína (Suarez et al., 2002).

Estos efectos del colesterol sobre la progresión del ciclo celular y sobre la expresión de la ciclina B1 son específicos. Así, salvo el desmosterol y el 7-deshidrocolesterol, ningún otro intermediario de la biosíntesis de colesterol ni otros análogos del colesterol son capaces de sustituir al colesterol a este respecto (Fernandez et al., 2005; Suarez et al., 2005). Los fitosteroles, que son los análogos del colesterol en plantas, tampoco permiten la progresión del ciclo celular en células de mamíferos tratadas con SKF 104976 (Suarez et al., 2002). Estos compuestos, sin embargo, son capaces de incorporarse a las membranas celulares de organismos eucariotas sin alterar sus propiedades (Suarez et al., 2002; Xu et al., 2001). Por tanto, la parada en G2 por deficiencia de colesterol parece deberse a algún tipo de respuesta de tipo regulador más que a la imposibilidad de formar nuevas membranas. Hay que señalar que los fitosteroles y otros análogos del colesterol son capaces de reprimir el procesamiento de los SREBPs y, con ello, la actividad transcripcional dependiente de elementos SRE, de forma similar a como lo hace el colesterol (Suarez et al., 2002; Suarez et al., 2005). Todo ello sugiere que las acciones del colesterol en el ciclo celular y en la regulación de los SREBPs se ejercen a través de distintos mecanismos. Abundando en las diferencias entre el colesterol y sus análogos, en nuestro laboratorio se demostró que el ergosterol (Suarez et al., 2002) y otros fitosteroles (Ledo Trujillo, 2005) son incapaces de estimular la expresión de la ciclina B1 y la actividad de la Cdk1 en células tratadas con SKF 104976, a diferencia del colesterol. Por lo tanto, esta acción sobre el complejo Cdk1-ciclina B1, que gobierna la transición de G2 a mitosis, debe contribuir a explicar los efectos de la deficiencia de colesterol sobre la progresión del ciclo celular comentados.

8.2. Promotor de la ciclina B1 (pCyc-B1): Regulación y elementos de respuesta implicados

Algunos genes de proteínas reguladoras del ciclo presentan expresión basal o inducible dependiendo del periodo del ciclo en que se encuentre la célula (Trembley et al., 2000). Tal es el caso de la ciclina B1, en cuyo promotor se han encontrado secuencias que confieren a este gen la capacidad de variar su expresión en distintas fases del ciclo (Farina et al., 1996; Farina et al., 1999; Hwang et al., 1995; Katula et al., 1997).

Los mecanismos moleculares necesarios para la activación del promotor de la ciclina B1 en G2/M son complejos y son muchos los factores de transcripción que regulan su expresión. En esta región, se han identificado elementos E-box (CACGTG) importantes para la expresión constitutiva de la ciclina B1 y CCAAT-box necesarios para su activación en ciclo (Cogswell et al., 1995; Ito, 2000 #38) (Fig 9). Sin embargo, parece que ninguno de ellos es capaz de inducirlo por sí solo, sino que son múltiples elementos y factores de transcripción los que colaboran para conseguir el efecto (Ito, 2000).

Varios factores de transcripción implicados en la regulación de la actividad del promotor de la ciclina B1 como AP-2 (*Activating enhancer binding Protein 2*), Sp1 (*Specific protein 1*), CBF/NF-Y (*CCAAT Binding Factor*) y USF (*Upstream Stimulatory Factor*), intervienen, además, en la activación de genes del metabolismo lipídico, lo que sugiere la posibilidad de que estos factores estén sujetos a una regulación mediada por esteroides (Yang et al., 2002c).

En regiones del pCycB1 cercanas al inicio de la transcripción, se localizan secuencias consenso que funcionan como sitios de respuesta para múltiples factores de transcripción (Fig 9): Existe un elemento de respuesta para NF-Y, uno para AP-2, dos para Sp1, y cuatro regiones E-box; de las cuales, dos son regiones consenso para la unión del factor MyoD, otra

es semejante a la secuencia consenso de unión a los factores E12/E47 y la última es una secuencia consenso para la unión del factor USF (Fig 9) (Cogswell et al., 1995; Faisst and Meyer, 1992). Además, la búsqueda de otros posibles sitios de unión a factores de transcripción en el pCycB1 mediante el TESS (*Transcription Element Search System*) revela la existencia de secuencias SRE/E-box y de secuencias que, con elevada probabilidad, pueden actuar como elementos de respuesta para USF (Fig 9).

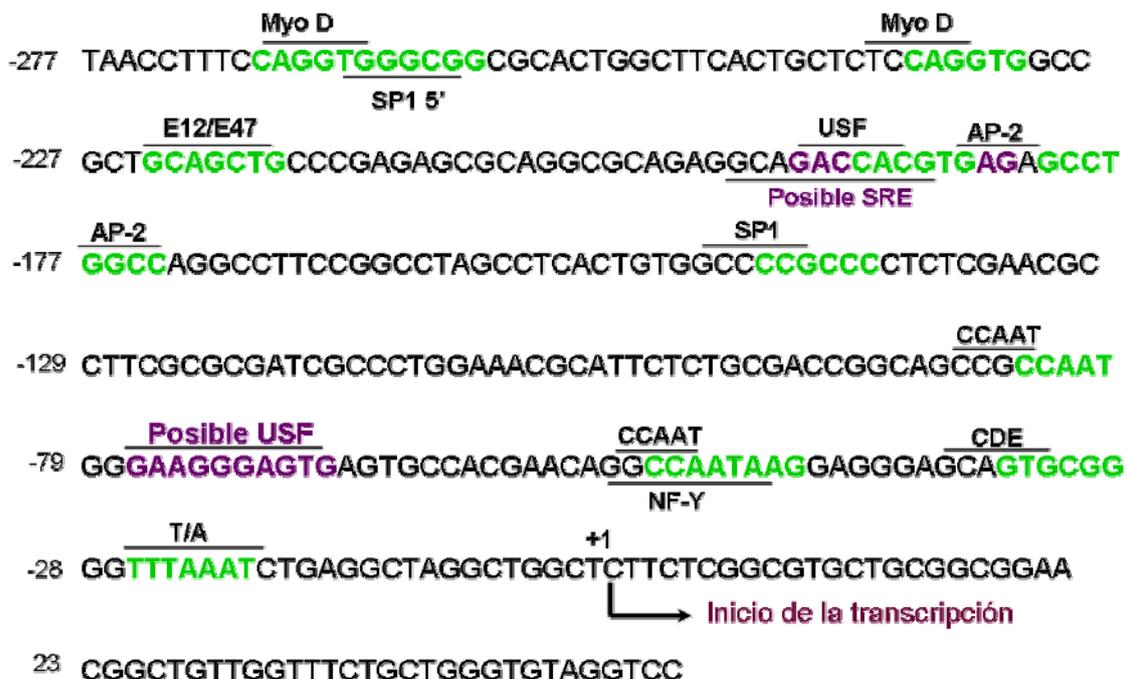


Figura 9. Parte de la región promotora del gen de la ciclina B1 humana donde aparecen los sitios de respuesta y factores de transcripción capaces de regular su expresión. Se muestran elementos de respuesta descritos en la literatura (en color verde) y candidatos a participar en el control de la expresión de la ciclina B1 (en color morado).

8.2.1. *AP-2*: Este factor es necesario en las fases tempranas del desarrollo embrionario (Auman et al., 2002) y está implicado en procesos de proliferación (Li et al., 2006) y diferenciación (Nottoli et al., 1998). Su interacción con el supresor de tumores p53 provoca una parada en las fases G1 del ciclo celular y aumenta la expresión del inhibidor de Cdks p21, contribuyendo a dicha parada (Li et al., 2006).

El promotor de la ciclina B1 contiene un sitio de unión a AP-2/Sp1 (Fig 9) importante en la regulación de su actividad tanto constitutiva como regulada por ciclo (Cogswell et al., 1995; Piaggio et al., 1995). La activación de su expresión mediante este elemento de respuesta está sujeta a distintos mecanismos de regulación. Los ésteres de forbol y concentraciones elevadas de AMPc inducen su actividad, aunque no su expresión (Ries et al., 1998). No se conoce si AP-2 puede ser activado por esteroides, aunque sí interacciona con otros factores como Sp1 en la regulación de la expresión de genes implicados en la homeostasis lipídica, como el que codifica para la lipasa ácida lisosomal (Ries et al., 1998).

8.2.2. *NF-Y*: El factor de transcripción CBF/NF-Y es necesario para la progresión del ciclo celular a través de G2/M. Este factor regula la actividad de determinados promotores humanos, como es el caso de la ciclina B1, a través de su unión a CCAAT-box (Fig 9) (Hu et al., 2006; Manni et al., 2001). La unión de este factor de transcripción a dos elementos de respuesta

CCAAT-box presentes en el promotor de la ciclina B1 (Fig 9) regula los cambios de expresión de esta proteína durante el ciclo celular (Katula et al., 1997). Esta unión es especialmente importante en la fase S, y es esencial para la activación de la ciclina B1 a través de complejos Cdk-ciclina. A este respecto, la actividad de NF-Y puede modularse mediante fosforilación por la actividad quinasa de los complejos Cdk-ciclina que actúan a través de otras proteínas. (Katula et al., 1997). Se propone que tales proteínas pueden ser factores de unión a elementos como el CDE (*Cell cycle-Dependent Element*) y CHR (*Cell cycle Homology Region*), todavía no identificados en el promotor de la ciclina B1 (Hu et al., 2006). Estos elementos CDE se han implicado en la regulación de la expresión de algunos genes en la fase S, e incluso se les ha atribuido un papel represor sobre el promotor de la ciclina B1 (Katula et al., 1997). A pesar de esto, no parecen ser necesarios para la correcta expresión de la ciclina B1 en el ciclo celular, ni en la inducción de la fase de síntesis (Katula et al., 1997)

8.2.3. Sp1: Es un factor implicado en la transcripción de muchos genes en respuesta a esteroides, como resultado de la interacción con otros factores. En el caso del receptor de LDL, los SREs presentes en su promotor no son capaces de activar la transcripción por sí solos cuando los niveles de esteroides en la célula son bajos (Sanchez et al., 1995; Yieh et al., 1995), sino que se requiere la presencia de dos sitios de unión a Sp1 para la correcta regulación de la transcripción por esteroides (Sudhof et al., 1987; Yieh et al., 1995). Existen genes, como el de la sintasa de ácidos grasos, para los que esta interacción aún no es suficiente. En este caso se hace necesaria la presencia de un elemento de respuesta a NF-Y, otro para Sp1 y dos elementos SRE en tandem para que se active la transcripción génica en respuesta a colesterol (Xiong et al., 2000).

En el caso del promotor de la ciclina B1 se han observado interacciones de Sp1 con NF-Y (Wright et al., 1994), pero parecen no ser necesarias para su activación en la fase S (Katula et al., 1997). En cambio, este factor sí está implicado en la represión de la ciclina B1 por p73 y lo hace de manera independiente de NF-Y (Innocente and Lee, 2005).

8.2.4. USF: Factor de transcripción ubicuo implicado en la transcripción de muchos genes mediante su unión como heterodímero a un elemento E-box (Cheung et al., 1999; Luo and Sawadogo, 1996). Entre los genes regulados por USF se encuentra el de la ciclina B1 (Cheung et al., 1999; Cogswell et al., 1995). También es capaz de activar la transcripción de genes a través de su unión a elementos CCAAT-box, pero no durante la fase S (Katula et al., 1997). Durante la fase de G2 su unión a un elemento E-box se encuentra aumentada (Cogswell et al., 1995; Hwang et al., 1995). Sin embargo, en esta fase del ciclo, su unión a dicha secuencia puede considerarse accesoria para la regulación de la expresión de la ciclina B1, ya que regiones del promotor carentes de este E-box mantienen la capacidad de aumentar la expresión de ciclina B1 por acción del USF (Hwang et al., 1995).

El USF es uno de los factores más importantes para el control de la transición entre las fases de S y G2/M pero se le atribuyen funciones contrarias dependiendo del tipo celular. En células HeLa, por ejemplo, deleciones de su elemento de respuesta resultan en una disminución del 40% en la actividad del promotor de la ciclina B1 (Cogswell et al., 1995). En contradicción con ello, en células FRTL-5, la sobreexpresión de USF provoca un descenso en los niveles de mensajero de ciclina B1, conduciendo a un retraso en el paso a través de G2/M en ciclo celular acompañado de un descenso en la expresión de Cdk1 (Jung et al., 2007). Estas observaciones contradictorias podrían explicarse teniendo en cuenta la participación de otros elementos de respuesta en el control de la transición entre G2 y mitosis, ya que, al deleccionar también la secuencia consenso para AP-2, la actividad del promotor disminuye todavía más (Cogswell et al., 1995).

Este factor también está implicado en la regulación de genes del metabolismo del colesterol, como el gen para ABCA1. En este caso ejerce un efecto inhibitorio sobre la expresión de ABCA1 mediante la unión a un E-box de su región promotora (Yang et al., 2002c).

8.2.5. SREBP: La presencia de sitios de respuesta a SREBP en el pCycB1 no se ha descrito por el momento, pero en dicho promotor existen secuencias con analogía con el sitio consenso, que podrían funcionar como sitios de unión para estos factores de transcripción (Fig 9).

De manera general, la forma madura de los SREBPs entra en el núcleo donde tiene la capacidad de unirse a elementos SRE (Horton et al., 2002) o E-box (Zeng et al., 2004). Sin embargo, los SREBPs en solitario no son capaces de activar la transcripción, sino que actúan en coordinación con otros factores para conseguirlo. Algunos de estos factores que se unen a elementos SREs en compañía de SREBP son Sp1 (Sanchez et al., 1995), NF-Y (Dooley et al., 1998), y CREB (Dooley et al., 1999). Recientemente, Griffin y colaboradores demostraron por primera vez que SREBP-1 interacciona con USF tanto *in vitro* como *in vivo* (Griffin et al., 2007).

Los genes activados por SREBP pertenecen en su mayoría a genes del metabolismo lipídico. Son genes que codifican para proteínas implicadas en la colesterogénesis, síntesis de ácidos grasos, lipogénesis y síntesis de triglicéridos y fosfolípidos y también genes del metabolismo de la glucosa (Sakakura et al., 2001). Los tres miembros de esta familia no activan de manera indistinta todo este conjunto de genes. SREBP-2 induce la expresión de las enzimas de las colesterogénesis (Sakakura et al., 2001), y especialmente de HMG-CoA reductasa (Horton et al., 1998). Por su parte, SREBP-1a activa, principalmente, la expresión de genes implicados en la síntesis de ácidos grasos. También induce la síntesis de enzimas implicadas en la elongación y desaturación de los ácidos grasos (Horton et al., 1998). Por último, SREBP-1c está implicado, esencialmente, en la regulación de la adipogénesis y en el control de la expresión de genes de respuesta a la insulina que dirigen la lipogénesis y el metabolismo de la glucosa (Flier and Hollenberg, 1999; Foretz et al., 1999).

Además de activar la transcripción de genes mediante su unión a elementos SREs, los SREBPs, son capaces de unirse a otros elementos de respuesta como los E-box (Amemiya-Kudo et al., 2002; Brown and Goldstein, 1999). En este sentido, Zeng y colaboradores describieron la regulación por SREBP-2 sobre la expresión de ABCA1 a través de un E-box localizado en su promotor. SREBP-2 ejerció en este caso, un efecto inhibitorio sobre la expresión de ABCA1 (Zeng et al., 2004).

Su expresión puede inducirse mediante glucagón, insulina y LXR y, de hecho, se han identificado elementos de respuesta a dichas hormonas, así como para LXR en la región promotora de SREBP (Janowski et al., 1996).

8.3. Regulación del promotor de la ciclina B1 por colesterol

Ante la posibilidad de una regulación de la actividad del promotor de la ciclina B1 por colesterol, es lógico pensar que dicha regulación ocurra a través de un SRE. Sin embargo, trabajos previos de nuestro laboratorio, anteriormente mencionados, sugieren que esta regulación es independiente de SREBP (Suarez et al., 2002). Así, en situaciones de inhibición de la colesterogénesis, otros esteroides, como el ergosterol, capaces de activar la maquinaria transcripcional regulada por esteroides (SREBPs), no consiguen aumentar los niveles de ciclina B1, ni la actividad de Cdk1 (Suarez et al., 2002). Por tanto, en la regulación de la actividad del promotor de la ciclina B1, podrían estar actuando otros factores de transcripción, solos o tal vez en colaboración con los SREBPs-SRE.

De su implicación en el ciclo celular se sabe que la actividad transcripcional de SREBP-1 se encuentra aumentada en células detenidas en G2/M por acción del nocodazol (Bengoechea-Alonso et al., 2005). Esto es debido a su fosforilación en Ser439 por acción del

complejo Cdk1-ciclina B, modificación que retrasa su degradación por el proteasoma (Bengoechea-Alonso and Ericsson, 2006). Aunque esto no ocurre con SREBP-2 - factor de transcripción que regula principalmente la expresión de los genes relacionados con la biosíntesis del colesterol y el receptor de LDL - la estabilización de SREBP-1 podría estar relacionada con el incremento en la biosíntesis de colesterol que ocurre durante esta etapa final del ciclo celular (Bengoechea-Alonso et al., 2005). Por otra parte, la inactivación de SREBP-1 mediante siRNA se ha observado que conduce a la parada del ciclo celular en G1 (Bengoechea-Alonso and Ericsson, 2006), lo que indica que el propio SREBP-1, o alguno de los genes que regula, también es necesario para la transición a S.

El USF es uno de los factores de transcripción más activos en la regulación de la expresión de la ciclina B1, además es capaz de interactuar con SREBP-1 (Griffin et al., 2007). Por tanto, cabe la posibilidad de que existan interacciones entre ambos que regulen la expresión de la ciclina B1 en situaciones de cambios en los niveles de colesterol en la célula. En otros promotores, como es el caso del gen de la lipasa hepática, la interacción entre estos dos factores regula su expresión en respuesta a cambios en los niveles celulares de colesterol. En este caso, el USF aumenta la actividad del promotor entre 4 y 6 veces respecto de su actividad basal, mientras que la atorvastatina, inhibidor de la HMG-CoA reductasa y que aumenta los niveles de SREBP, o un vector de expresión de SREBP-2, impiden este aumento de actividad. Por tanto, el SREBP interfiere en la estimulación del promotor por parte del USF y además parece que esta interacción entre estos dos factores es independiente de sitios SRE o E-box. (Botma et al., 2005). En el caso del promotor de la sintasa de ácidos grasos se ha observado que sin la unión del USF a su promotor, la activación mediada por SREBP-1c disminuye considerablemente ($\approx 70\%$), además, su actividad máxima en respuesta a insulina, sólo se consigue por la interacción entre USF y SREBP-1c (Griffin et al., 2007).

Objetivos

Objetivos

La finalidad del presente trabajo ha sido profundizar en el conocimiento del papel biológico del colesterol. En la Introducción se han expuesto distintas acciones del colesterol y los efectos de su deficiencia en diversos procesos celulares. El conocimiento de la implicación del colesterol en la función del adipocito y de la repercusión de la extracción del colesterol de membrana sobre la capacidad de los preadipocitos 3T3-L1 para diferenciarse nos llevó a plantear el estudio de los efectos de la inhibición de la biosíntesis de colesterol sobre este proceso, que ocupa los tres primeros objetivos.

Posteriormente, quisimos ahondar en el estudio de la funcionalidad de los "lipid rafts" en situaciones de inhibición de la colesterogénesis. Para ello, iniciamos el estudio de la estructura y funcionalidad de los "lipid rafts" en células SH-SY5Y utilizando como inhibidor de la colesterogénesis, el haloperidol, con objeto de esclarecer las causas de algunos de los efectos adversos que este fármaco provoca. Esta idea se concreta en el objetivo cuatro de esta tesis.

Finalmente, en nuestro laboratorio está ampliamente descrita la detención del ciclo celular por efecto de la inhibición de la colesterogénesis, que se acompaña de una disminución de la expresión de la ciclina B1. A este respecto, nos propusimos emprender la búsqueda de los elementos de respuesta presentes en el promotor de este gen que participaran en la regulación de la expresión de la ciclina B1 por esteroides. Con estos antecedentes planteamos el quinto y último objetivo.

En resumen, los objetivos concretos fueron:

1. Estudiar los efectos de la deficiencia de colesterol sobre la adipogénesis en células 3T3-L1.
2. Determinar las vías de transducción de señales afectadas por la inhibición de la síntesis de colesterol en la adipogénesis.
3. Estudiar los efectos de la inhibición de la colesterogénesis sobre la estructura y funcionalidad de los "lipid rafts" en los preadipocitos 3T3-L1.
4. Analizar los efectos del haloperidol en los "lipid rafts", estudiando la señalización mediada por somatostatina e insulina en células SH-SY5Y de neuroblastoma.
5. Determinar los elementos implicados en la regulación por colesterol del promotor de la ciclina B1.

Material y Métodos

Material y Métodos

1. Inhibidores de la biosíntesis de colesterol y esteroides

Algunos de los inhibidores de la síntesis de colesterol fueron donados amablemente por distintos laboratorios. El SKF 104976 lo proporcionaron los laboratorios GlaxoSmithKline p.l., el AY 9944 los laboratorios Wyeth-Ayerst Research, y la atorvastatina los laboratorios Pfizer. El triparanol y el haloperidol se compraron a Sigma. Estos cinco inhibidores fueron disueltos en DMSO, de manera que la concentración final de este solvente en el cultivo fuera 0,044%. Los esteroides (colesterol y el 5,22-colestadien-3 β -ol) fueron de Steraloids Inc., y se disolvieron en etanol, cuya concentración final en el medio de cultivo fuera 0,44%.

El resto de reactivos empleados fueron de calidad para análisis.

2. Líneas y cultivos celulares

2.1. Células 3T3-L1

La línea celular 3T3-L1 son preadipocitos de ratón (ATCC CL-173). Estas células se mantuvieron en *Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)* con alta concentración en glucosa (Gibco) suplementado con 10% de FBS (*Foetal Bovine Serum*) (Gibco), 100 U/ml de penicilina (Gibco), 100 μ g/ml de estreptomina (Gibco), 10 μ g/ml de gentamicina (Gibco) y 0,1 mM de aminoácidos no esenciales (Gibco), en atmósfera de CO₂ al 5%.

2.2. Células SH-SY5Y

La línea celular humana de neuroblastoma SH-SY5Y (ATCC CRL-2266) se incubó en medio RPMI 1640 (RPMI) (Lab-Clinics), suplementado con 10% de FBS, 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomina, 10 μ g/ml de gentamicina y 2 mM de L-Glutamina (Gibco), en atmósfera de CO₂ al 5%.

2.3. Células MOLT-4

La línea celular de linfoblastoma humano MOLT-4 (ATCC CRL-1582) se incubó en medio RPMI suplementado con 10% FBS, 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomina, 10 μ g/ml de gentamicina y 2 mM de L-Glutamina, en atmósfera de CO₂ al 5%.

3. Obtención de lipoproteínas (LDL y DiI-LDL) y suero deficiente en lipoproteínas

Las LDL (densidad 1,019-1,063 kg/l) se aislaron mediante ultracentrifugación durante 4h según el método descrito por Brown y colaboradores (Brown and Goldstein, 1974) a partir de dializados humanos de pacientes con hipercolesterolemia sometidos a aféresis de LDL en el Hospital Ramón y Cajal

Las DiI-LDL se elaboraron a partir de LDL humanas aisladas marcándose con la sonda fluorescente DiI (1,1'-dioctadecil-3,3,3,3'-tetrametil-in-docarbocianinaperclorato) (Molecular Probes, Invitrogen) según el método descrito por Calvo y colaboradores (Calvo et al., 1998).

El suero deficiente en lipoproteínas (LPDS, *LipoProtein Deficient Serum*) se obtuvo mediante ultracentrifugación de FBS a densidad 1,24 kg/l durante 40h. Antes de su utilización,

las LDL y el LPDS se dializaron exhaustivamente frente a NaCl 0,15M, pH 7,4 y se esterilizaron con filtros de 0,22 μm .

4. Diferenciación de células 3T3-L1 a adipocitos

La línea de preadipocitos de ratón 3T3-L1 se mantuvo en cultivo en medio DMEM suplementado con FBS y antibióticos a 37°C en una atmósfera con CO₂ al 5% (Fig 10). Tras dos días de haber alcanzado la confluencia, se indujo la diferenciación de estas células a adipocitos mediante la administración de un “cocktail” adipogénico estándar compuesto de isobutilmetilxantina o IBMX (inhibidor de la fosfodiesterasa de cAMP) (Sigma) a una concentración de 500 nM, dexametasona (un glucocorticoide sintético) (Sigma) a una concentración de 0,25 μM e insulina (Actrapid) a la concentración suprafisiológica de 600 nM (Fig 10). Las células se mantuvieron en estas condiciones durante otros dos días. (Fig 10). Transcurrido este tiempo (día 2 de diferenciación), las células se incubaron en DMEM, esta vez suplementado sólo con insulina 600 nM y se mantuvieron en este medio hasta el final de la diferenciación realizando cambios de medio cada dos días (Fig 10).

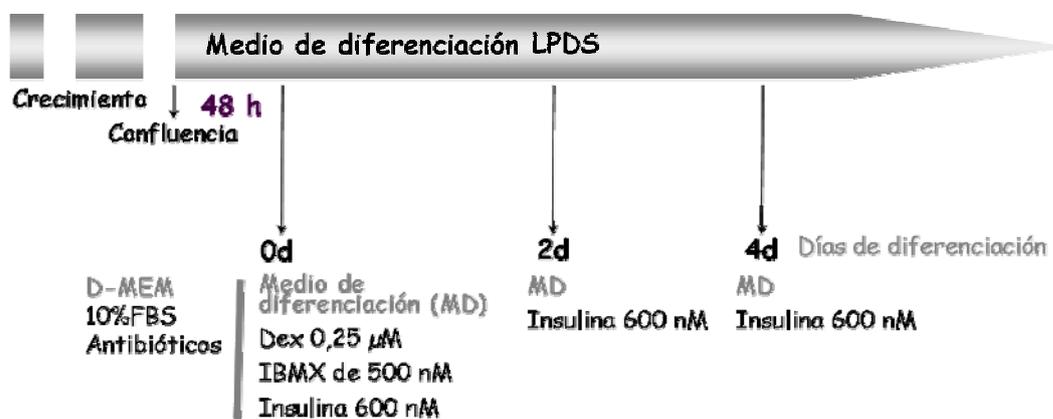


Figura 10. Protocolo de diferenciación de las células 3T3-L1 a adipocitos. Se explica esquemáticamente la estrategia de diferenciación y se indica la composición del medio utilizado y el momento del programa en que es administrado a las células.

5. Tinción con Oil Red-O y determinación de su absorbancia a 510 nm

Esta tinción fue utilizada para monitorizar la acumulación de lípidos neutros durante la diferenciación de las células 3T3-L1 a adipocitos. Las células 3T3-L1 diferenciadas durante 5 días se lavaron dos veces en PBS, se fijaron con formaldehído al 3,7% durante 30 min a temperatura ambiente y posteriormente se tiñeron con una solución de Oil Red-O a 3 mg/ml en isopropanol al 60% durante 1 h. Las acumulaciones lipídicas se observaron en un microscopio óptico Olympus BX51. Para la determinación de su absorbancia a 510 nm, el Oil Red-O incorporado a los lípidos neutros se extrajo con isopropanol y se midió su absorbancia a 510 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 640.

6. Análisis del contenido de colesterol y triglicéridos

Se determinaron los niveles de colesterol y triglicéridos mediante el uso de métodos enzimáticos de Menarini Diagnostics siguiendo el protocolo de utilización.

7. Determinación del contenido y la síntesis de esteroides por HPLC (High-Performance Liquid Chromatography)

Para el análisis de la síntesis de esteroides se siguió el método de Fernández y colaboradores (Fernandez et al., 2002). Se incubaron 10^6 de células 3T3-L1 en medio con 10% de LPDS y con distintos inhibidores de la colesterogénesis; después de 2h de preincubación en esas condiciones, se añadieron al medio 40 μCi de $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ -acetato (58 mCi/mmol) (Amersham-GE Healthcare) prolongándose la incubación durante 8h más.

Para la determinación del contenido de esteroides (Fernandez et al., 2002), las células 3T3-L1, se incubaron en medio con 10% de LPDS y los distintos tratamientos.

En ambos casos, una vez transcurrido el tiempo adecuado, las células se recogieron y se sedimentaron por centrifugación, se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron finalmente en 500 μl de KOH (10%), para lisar las células. Luego se extrajeron los lípidos con cloroformo/metanol (2:1) y, a partir de este extracto, se separaron los lípidos no saponificables tras saponificación con potasa etanólica y extracción con hexano (Folch et al., 1957). Esta última fracción se inyectó en el equipo de HPLC. El porcentaje de recuperación total del proceso se determinó en cada caso con un estándar interno y fue siempre superior al 60%.

La separación cromatográfica se realizó con una columna de fase reversa Luna 5 μm C18 (250x4,60 mm, Phenomenex, Torrance, CA). Los lípidos se eluyeron con acetonitrilo-agua (95:5, v/v) durante los primeros 37 minutos y a continuación se prosiguió la elusión con metanol absoluto a un flujo de 1,2 ml/min. El efluente fue monitorizado simultáneamente por ultravioleta (UV) (Beckman 168 detector de onda variable; Beckman Instruments) y radioactividad (LB-506 C-1, Berthold). La identificación de los esteroides se realizó por comparación con los tiempos de retención de estándares puros y por análisis del espectro UV.

8. Análisis de esteroides mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC/MS)

Las células 3T3-L1 o SH-SY5Y se incubaron en LPDS al 10% con triparanol 3 μM o haloperidol 10 ó 50 μM , respectivamente y se extrajeron los esteroides según lo descrito en el apartado anterior. Para el análisis de los esteroides mediante GC/MS se siguió la técnica descrita por Giera y colaboradores (Giera et al., 2007). Los esteroides extraídos fueron disueltos en *tert*-butilmetileter (TBME) y convertidos en sus éteres trimetilsilil por acción del N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida:trimetilsililimidazol (9:1). Las distintas muestras se analizaron por cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC/MS). El equipo utilizado fue un GC Varian GC 3800 acoplado a un espectrómetro de masas Varian Saturn 2000. Las condiciones de operación fueron: ionización por impacto de electrones (IE) a 40 μamp con un primer escaneo de los 9 a los 13 min de 50 a 450 m/z cada 0,4 segs y un segundo de los 13 a los 17 min de 100 a 550 m/z cada 0,4 seg. La fuente de iones (Varian 1177) y la línea de transferencia se mantuvieron a 250 y 270°C, respectivamente. En este equipo la columna empleada fue una Varian EZ Guard Factor Four 5MS de 30 m, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 μm de fase estacionaria (+10 m adicionales de columna desactivada "methyl guard"). El programa de temperaturas empleado fue: 50°C (1 min) / 260°C (50°C/min) / 310°C (4°C/min).

9. Aislamiento de extractos celulares para el análisis de proteínas

9.1. Extractos citoplásmicos y nucleares

Los extractos celulares citoplásmicos y nucleares se obtuvieron mediante la utilización del kit NE-PER (Pierce) siguiendo las instrucciones del fabricante.

9.2. Extractos totales para proteínas fosforiladas

Dichos extractos se obtuvieron mediante lisis celular a 4°C durante 1h en un tampón 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 125 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 5 mM NaF, 1,4 mM NaP pyro, 1 mM Na₃VO₄, suplementado con inhibidores de proteasas (Calbiochem o Pierce).

9.3. Valoración de proteínas

En ambos casos, la concentración de proteínas se determinó mediante ácido bicinconínico con el kit *BCA Protein Assay* (Pierce).

10. Métodos de concentración de extractos proteicos

10.1. Precipitación con ácido tricloroacético (TCA)

Volúmenes con la misma cantidad de proteínas se mezclaron con TCA de manera que éste quedara al 10% y se mantuvieron en hielo durante al menos 20 min. Se centrifugaron a 16.000 g durante 10 min y se lavó el sedimento dos veces con etanol:etilacetato (1:1). Los precipitados se disolvieron directamente en tampón de carga para electroforesis.

10.2. Concentración por centrifugación en filtros Centricon®

Volúmenes con la misma cantidad de proteínas se concentraron mediante el sistema de centrifugación en filtros Centricon con membranas Ultracel YM de 30.000 NMWL (Millipore) según las indicaciones del fabricante.

11. Aislamiento de membranas

Las células SH-SY5Y se incubaron en frascos de cultivo de 175 cm², se recogieron, se sedimentaron por centrifugación y se resuspendieron en tampón HEPES 10 mM, pH 7,6 suplementado con inhibidores de proteasas. Las células se lisaron mediante sonicación durante 15 seg y se centrifugaron a 600 g durante 10 min para eliminar los núcleos y restos celulares. El sobrenadante se centrifugó a 48.000 g durante 30 min en un rotor TLA 100.2 (Beckman) y una ultracentrífuga Beckman TL-100 (Beckman Instruments). Se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en tampón HEPES 10 mM, pH 7,6 y se centrifugó de nuevo a 48.000 g durante otros 30 min. El sedimento final se resuspendió en Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 y se midió la concentración de proteínas.

12. Fraccionamiento de membranas plasmáticas en gradiente de densidad en sacarosa

Para separar las distintas fracciones de la membrana plasmática desarrollamos un procedimiento basado en el método de aislamiento de "lipid rafts" sin detergentes ideado por Song y colaboradores (Song et al., 1996). En nuestro caso, sembramos células 3T3-L1 en frascos de cultivo de 175 cm² y después de los distintos tratamientos las lavamos dos veces en PBS frío. Tras eliminar cualquier resto de PBS, las células se rasparon en 2 ml de tampón Na₂CO₃ 500 mM, pH 11 y se sonicaron mediante dos pulsos de 30 segundos cada uno para lisarlas. Después, se centrifugaron a 14.000 g durante 30 min para obtener un extracto de

membranas sin restos de membranas de orgánulos celulares como el Golgi. Estos extractos de membrana se sonicaron con 2 pulsos de 30 seg en posición 3 y otros 2 en posición 2 de output en un sonicador Vibracell (Sonics&Materilas, Inc) con objeto de fraccionar las membranas contenidas en dicho extracto. A continuación se valoró la cantidad de proteínas de estos lisados enriquecidos en membranas plasmáticas mediante BCA. Volúmenes de estos extractos de los distintos tratamientos con la misma cantidad de proteína que resultaban ser muy semejantes y aproximadamente de 2 ml, se mezclaron en un tubo de centrifuga con un volumen igual de sacarosa al 85% en tampón MBS (25 mM Mes, 0,15 M NaCl, pH 6,5) de manera que quedaban a una concentración final de sacarosa de 42,5%, constituyendo la fracción inferior del gradiente de sacarosa. Sobre ella, se estableció un gradiente discontinuo de densidad de sacarosa del 35% al 5% en MBS de la siguiente manera: 1 ml de sacarosa al 35%, 5 ml de sacarosa al 30% y por último, 2 ml de sacarosa al 5%. Este gradiente discontinuo de sacarosa se centrifugó durante a 39.000 rpm durante 18-20 h a 4°C en un rotor SW41 y una ultracentrífuga Beckman L70 (Beckman Instruments). Gracias a esta centrifugación se establece un gradiente continuo de densidad de sacarosa en el que están distribuidas las distintas fracciones de membrana según su densidad. Desde la parte superior del tubo se recogieron 12 fracciones de 1 ml cada una, se valoró su concentración proteica mediante BCA y se procesaron para los ensayos de western-blot y determinaciones lipídicas.

13. Estimulación con insulina

Las células 3T3-L1 o SH-SY5Y se incubaron en medio con LPDS al 10%, con los distintos tratamientos. Entre 2 y 4 horas antes de la estimulación con insulina las células se incubaron en medio sin LPDS ni FBS para privarlas de cualquier estímulo. Transcurrido este tiempo, las células 3T3-L1 se estimularon con insulina (Sigma) 20 nM y las SH-SY5Y con insulina 100 nM (Sigma) durante 10 min, para el análisis de la vía de señalización del RI en las distintas fracciones del gradiente. Para el análisis de la fosforilación de Akt, las células se estimularon con insulina 1 µM y los lisados celulares se analizaron mediante western-blot.

14. Inmunodetección o Western-blot

Para la inmunodetección de las distintas proteínas, se analizaron 50-100 µg de proteína total o 50 µg de proteína nuclear de las distintas condiciones. Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida al 8, 10 ó 12% según las proteínas objeto de estudio. Posteriormente, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) a 100 V durante 1h o a 15v durante toda la noche a 4°C. La unión de los anticuerpos primarios a proteínas inespecíficas se bloqueó con el uso de leche al 5% o caseína al 0,1% en TBS (*Tris Buffer Saline*) con Tween 20 al 0,1% (Sigma). Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios específicos de cada proteína (Tabla 1), disueltos en TBS-Tween 0,1% o en leche al 1% en TBS-Tween 20 0,1% durante 2h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C según los requerimientos de cada proteína. La detección de los anticuerpos primarios unidos a las proteínas se realizó mediante el uso de anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa (HRP, *HorseRadish Peroxidase*) (Santa Cruz Biotechnology, Inc) o a fosfatasa alcalina (Jackson ImmunoResearch). En el caso de anticuerpos acoplados a HRP, las bandas se visualizaron mediante detección de quimioluminiscencia en el VersaDoc Imaging System (Bio-Rad) con el uso de Immuno-Star HRP (Bio-Rad) siguiendo su protocolo de utilización; o mediante métodos colorimétricos utilizando el tampón FA (Tris-Base 100 mM, NaCl 100 mM y MgCl₂ 5 mM) con NBT (*NitroBlue Tetrazolium*) (30 mg/ml): BCIP (*5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate*); 1:1 (Bio-Rad) en el caso de secundarios acoplados a fosfatasa. Las membranas se tiñeron con rojo Ponceau S (Merck) al 0,1% en ácido acético al 5% para confirmar igualdad de carga de

Material y Métodos

proteína en todos los tratamientos y su correcta transferencia a las membranas de nitrocelulosa.

Nombre del anticuerpo (Anti-)	Casa comercial
GAPDH	Santa Cruz Biotechnology (sc-25778)
C/EBP β	Santa Cruz Biotechnology (sc-150)
fosfo-C/EBP β (p-C/EBP β)	Cell signaling (#3084S)
PPAR γ	Abcam (ab19481)
LXR α	Santa Cruz Biotechnology (sc-1206)
C/EBP α	Santa Cruz Biotechnology (sc-9314)
Adipsina	Santa Cruz Biotechnology (sc-12402)
aP2/FABP4	R&DSYSTEMS (AF1443)
fosfo-p38 (p-p38)	Cell signaling (#9216)
p38 total	Cell signaling (#9212)
fosfo-ERK1/2 (p-ERK1/2)	Cell signaling (#9106)
ERK total	Sigma (M5670)
fosfo-Akt (p-Akt)	Cell signaling (#9271)
Akt total	Cell signaling (#9272)
fosfo-JNK (p-JNK)	BD Biosciences (612540)
JNK total	BD Biosciences (554285)
Caveolina-1	Santa Cruz Biotechnology (sc-894)
Receptor de transferrina (RTf)	Zymed (13-6800)
Flotilina-1	BD Transduction (610820)
fosfo-Tirosina (p-Tyr)	Santa Cruz Biotechnology (sc-508)
Receptor de insulina subunidad β (RI β)	Santa Cruz Biotechnology (sc-711)
Fyn	Santa Cruz Biotechnology (sc-16)
LAMP2	Abcam (ab25631)

Tabla 1. En esta tabla se muestran los anticuerpos primarios utilizados para western-blot e inmunocitoquímica indicando las casas comerciales correspondientes de donde fueron adquiridos.

15. Inmunoprecipitación del RI

Volúmenes de las fracciones 2 y 3 de un gradiente en densidad de sacarosa con la misma cantidad de proteínas se concentraron mediante el sistema de centrifugación en filtros Centricon y se añadió, a los volúmenes resultantes, 2 µg de anticuerpo anti-RI subunidad β, 1,8 µg de BSA, así como inhibidores de proteasas y de fosfatasas (NaF 5,3 mM y Na₄P₂O₇ 0,07 mM). Esta mezcla se mantuvo girando durante 2 h a 4°C. Posteriormente se les añadió 25 µl de proteína A sepharosa (GE-Healthcare) equilibrada y se mantuvieron girando durante otra hora a 4°C. Finalmente, se centrifugaron, se lavaron con tampón de inmunoprecipitación (Tris-Base 50 mM, NaCl 125 mM, NaF 5,3 mM, Na₄P₂O₇ 0,07 mM, EDTA N₂ 1 mM y NP-40 al 1%, pH 7,5) y se resuspendieron en tampón de carga para electroforesis.

16. Marcaje de Tyr¹¹-Somatostatina-14 con Na¹²⁵I

El marcaje de la Tyr¹¹-SRIF-14 (Universal Biological Ltd.) se realizó según el método descrito por Greenwood y colaboradores (Greenwood et al., 1963). La reacción de marcaje se llevó a cabo a temperatura ambiente. Para ello, la Tyr¹¹-SRIF-14 se disolvió en tampón fosfato potásico 0,3 M, pH 7,5, al que se le añadió 1 mCi de Na¹²⁵I (100 mCi/ml) (Perkin-Elmer) y una disolución de Cloramina T (C₇H₇ClNaO₂·S·H₂O) al 0,2% en tampón fosfato potásico y se agitó la mezcla durante 30 seg. Finalmente, se agregó metabisulfito sódico (Na₂S₂O₅) al 0,4% en tampón fosfato potásico para detener la reacción. Esta mezcla de reacción se purificó en una columna Sephadex G-25 fino equilibrada con ácido acético 0,1 M con BSA 0,1% por adición de tampón de elución a razón de 30 ml cada hora y se recogieron alícuotas de 1 ml para medir su radioactividad y realizar el perfil de marcaje, del que se conoce el pico correspondiente al péptido marcado ¹²⁵I-Tyr¹¹-SRIF. Por último, se mezclaron los tubos correspondientes al péptido marcado y se alicuotaron.

Para determinar el porcentaje de incorporación de ¹²⁵I al péptido (Tyr¹¹-SRIF) se realizó el test de adsorción en talco, que consiste en añadir a 1 ml de suspensión de talco 5% en tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,4), 1 ml de una dilución 1:1.000 de la mezcla de reacción sin purificar en tampón fosfato sódico 0,1 M, pH 7,4. La mezcla se centrifugó a 750g durante 10 min, se descartó el sobrenadante y se midió la radioactividad emitida por el sedimento. Conociendo las cpm de la muestra anterior al test y la radioactividad del sedimento, se calcula el porcentaje de incorporación ($1\% = \text{cpm sedimento} / \text{cpm total} \times 100$).

17. Unión de la somatostatina a sus receptores específicos en membranas de células SH-SY5Y (Ensayos de "Binding")

Estos ensayos así como la determinación de la actividad de la adenilato ciclasa que se comenta en el apartado siguiente, se realizaron con la colaboración de los Dres. Eduardo Arilla, Alberto Hernández y Lilian Puebla, de la Universidad de Alcalá. La unión específica de la SRIF se determinó mediante un método modificado de Czernik y Petrack (Czernik and Petrack, 1983). Se realizaron incubaciones de los extractos de membrana obtenidos como se describe en el apartado 11 de Material y Métodos con distintas concentraciones crecientes de SRIF fría (10⁻¹¹-10⁻⁷) y una concentración fija (250 pM) de ¹²⁵I-Tyr¹¹-SRIF en tampón de incubación (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, MgCl₂·6H₂O 5 mM, BSA 0,2% y bacitracina 0,1 mg/ml). En los tubos con concentración 0 de SRIF fría se alcanzó el volumen final de la mezcla con tampón de incubación. Las distintas reacciones se incubaron en un baño a 30°C durante 1 h y después se centrifugaron a 11.000 g durante 2 min. Se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) y sacarosa al 9%, determinándose las cpm en un contador y Wallac Pharmacia 1282 Compugamma CS (Perkin-Elmer).

La unión no específica se determinó a partir de la cantidad de radioactividad unida en presencia de SRIF 10^{-6} M. Los datos obtenidos de los ensayos se corrigieron mediante este valor para obtener los datos de unión específica. Estos últimos datos se representaron y analizaron según el método de Scatchard (Scatchard, 1949) para obtener los parámetros de la constante de disociación (Kd) y capacidad máxima de unión (Bmax).

18. Determinación de la actividad de la adenilato ciclasa

El método aplicado para el estudio de la actividad de la AC fue una modificación del método de Houslay y colaboradores (Houslay et al., 1976a; Houslay et al., 1976b). La medida de la actividad de la AC se realizó cuantificando el AMPc producido mediante el método de la proteína enlazante, que consiste en establecer una competición entre el AMPc producido y el [3 H]-AMPc añadido al medio, que compiten por unirse a la PKA (*Protein Kinase A*). Los diferentes extractos de membrana a una concentración de 0,4 mg proteína/ml se incubaron en presencia de 1,5 mM ATP, 5 mM MgSO₄, 10 μ M GTP y de un sistema regenerador de ATP (7,5 mg/ml creatina fosfato y 1 mg/ml creatina quinasa), 1 mM IBMX, 0,1 mM fenilmetilsulfonilico, 1 mg/ml bacitracin, 1 mM EDTA, y la sustancia a testar (10^{-4} M SRIF o 10^{-5} M forskolina (FK)) en 0,1 ml de 0,025 M TEA (Trietanolamina) (pH 7,4). Esta mezcla se incubó a 30°C durante 15 min en un baño con agitación; la reacción se detuvo por desnaturalización al calentar en un baño durante 3 min. Una vez frío, se procesaron junto con una curva estándar de AMPc entre 5-300 pmol/ml; se añadió una suspensión de alúmina (0,75 mg/ml de alúmina en TEA), siempre en agitación, y se centrifugó a 3.200 g a 4°C durante 10 min.

A todos los tubos se les añadió una solución de la PKA en tampón fosfato 0,2 M (pH 6,5), con teofilina 8 mM, β -mercaptoetanol 6 mM, EDTA 5 mM y BSA 2%, se incubaron durante 90 min a 4°C para que el AMPc se uniera a la PKA. Posteriormente se añadió 6,25 mM de [3 H]-AMPc en tampón fosfato 0,05 M (pH 6,5) y se incubaron durante 2 h a 4°C. A continuación, se añadió carbón activo 2,6%, BSA 2% en tampón fosfato excepto a los tubos de actividad total y se mantuvieron a 4°C durante 15 min, se centrifugaron las muestras a 3.200 g durante 10 min a 4°C y se midió la radioactividad presente en los sobrenadantes con líquido de centelleo en un contador β Wallac Pharmacia 1410 (Perkin-Elmer)

En todos los casos se determinaron distintas actividades de la AC: la actividad basal, la inhibición de la actividad basal (en presencia de SRIF 10^{-4} M), la actividad estimulada (en presencia de FK 10^{-5} M) y la inhibición de la actividad estimulada (en presencia de SRIF 10^{-4} M y FK 10^{-5} M). Las concentraciones de SRIF y FK utilizadas fueron aquellas capaces de estimular e inhibir, respectivamente la actividad de la AC en cerebro de rata (Schettini et al., 1989).

19. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo

19.1. Distribución del ciclo celular

Las células 3T3-L1 se diferenciaron durante distintos tiempos. Después, se recogieron y sedimentaron por centrifugación y se lavaron con PBS. A continuación, se fijaron con etanol al 70% durante 30 min a -20°C. Una vez fijadas, se lavaron 2 veces más con PBS y se incubaron en PBS con 100 μ g/ml de ribonucleasa A (Sigma) y 50 μ g/ml de yoduro de propidio (Sigma) en oscuridad durante 1h a 37°C. Finalmente, las células se analizaron en el citómetro de flujo (FACScalibur, Becton-Dickinson), adquiriéndose 10.000 células por condición.

19.2. Incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU)

Durante 20h de diferenciación, las células se incubaron con los diferentes tratamientos y con BrdU (Sigma) a una concentración final de 10 μ M. A continuación, las células se tripsinizaron, sedimentaron por centrifugación y se lavaron 2 veces con PBS. Se fijaron con etanol al 70% a -20°C durante al menos 30 min. Seguidamente, se lavaron 2 veces con PBS se incubaron durante 20 min en HCl 2N a temperatura ambiente para desnaturalizar el DNA, se resuspendieron en 1 ml de tampón borato ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) 0,1 M, pH 8,4, y se centrifugaron. Posteriormente, se lavaron con PBS y se resuspendieron en 500 μ l de la solución de bloqueo, compuesta por Tween 20 al 0,5% y NGS (*Normal Goat Serum*, suero normal de cabra) al 1% en PBS, durante 15 min a temperatura ambiente. A continuación, las células se centrifugaron, se resuspendieron en la solución de bloqueo con el anticuerpo primario contra la BrdU conjugado con FITC (Becton-Dickinson) y se incubaron durante dos horas en oscuridad y a temperatura ambiente. Finalmente, las células se lavaron dos veces con Tween 20 al 0,5% en PBS, se tiñeron con yoduro de propidio (descrito en el apartado anterior) y se analizaron mediante citometría de flujo. En todos los casos se analizaron al menos 15.000 células por condición.

20. Inmunocitoquímica

20.1. Marcaje del gangliósido GM1

Para una mayor eficiencia de este marcaje se hace necesario que las células no estén previamente fijadas. De esta manera, las células 3T3-L1 o SH-SY5Y se sembraron a una concentración de 30.000-40.000 células/ml en cubreobjetos de 20mm de diámetro y después del tratamiento se eliminó el medio de cultivo y se lavaron dos veces con PBS. Posteriormente se incubaron con la CtxB-FITC (Sigma) en PBS durante media hora a temperatura ambiente. Por último, las células se lavaron dos veces con PBS y se prosiguió con el protocolo normal de tinción de filipina o inmunocitoquímica descritos a continuación.

20.2. Tinción con filipina

Las células 3T3-L1 o SH-SY5Y se sembraron en las condiciones descritas en el marcaje de GM1 y después del tratamiento se fijaron con formaldehído al 4% durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se tiñeron durante 45 minutos a temperatura ambiente en oscuridad con filipina (Sigma) (35 μ g/ml) en PBS preparada a partir de una solución de stock de filipina al 2,5 mg/ml disuelta en etanol. Finalmente, las células se lavaron 3 veces en PBS y se procesaron para inmunocitoquímica.

20.3. Inmunocitoquímica y microscopía de fluorescencia y confocal

Las células 3T3-L1 o SH-SY5Y se sembraron y fijaron como se ha indicado en los dos apartados anteriores. Posteriormente, las células se permeabilizaron con Tritón X-100 al 1% en PBS durante 5 min a temperatura ambiente y se bloquearon con BSA al 2% en PBS durante al menos 45 min. A continuación, se incubaron durante 2h a temperatura ambiente con anticuerpos primarios específicos (Tabla 1) para las distintas proteínas disueltas en BSA al 2%. Los anticuerpos primarios se lavaron 3 veces con PBS y las células se incubaron con los anticuerpos secundarios adecuados a cada caso conjugados con Alexa 488 ó 568 (Molecular Probes, Invitrogen) durante 40-45 min y se lavaron 3 veces con PBS. Finalmente, los núcleos se tiñeron con TO-PRO 3 (Molecular Probes, Invitrogen) 1 μ M durante 10-15 minutos, se

lavarón 3 veces con PBS y se montaron en los portaobjetos en medio de montaje “non-fade” con fenilendiamina (Sigma) 1 mg/ml en glicerol. Las células marcadas con filipina se observaron en un microscopio de fluorescencia Olympus BX51 (Olympus España, S.A., Barcelona, España) mientras que los marcajes sin filipina se observaron mediante microscopía confocal empleando el Imaging Center Bio-Rad MRC-1024 confocal laser scanning imaging system (BioRad).

21. Captación de glucosa

Las dos horas previas al ensayo, las células 3T3-L1 se mantuvieron en medio de ayuno compuesto por medio DMEM suplementado con antibióticos y aminoácidos no esenciales (ver líneas y cultivos celulares) con BSA al 2%. Posteriormente, las células se incubaron en ausencia o presencia de insulina 100 nM durante 30 min a 37°C. Durante los últimos 10 min se realizó ensayo de captación de glucosa mediante la adición de 2-deoxi-D-glucosa (a la concentración final de 1mM), con 0,5 mCi de 2-deoxi-D-[³H] glucosa (18,3 Ci/mmol) (Amersham-GE Healthcare) en tampón Krebs-Ringer-Hepes pH 7,4 (20 mM Hepes; 136 mM NaCl; 4,7 mM KCl; 1,18 mM MgSO₄; 2,5 mM CaCl₂; 1,18 mM KH₂PO₄ y 2 mM de piruvato sódico). Transcurridos esos 30 min y para bloquear la captación de glucosa radioactiva, las células se lavaron 3 veces con D-glucosa 50 mM en PBS frío. Posteriormente, las células se lisaron con NaOH 0,1 N con SDS al 1% en frío y se recogieron alícuotas para determinar la radiactividad [³H] incorporada en el detector Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb 2800 TR (Perkin-Elmer precisely). El valor de dpm obtenido de las mediciones se corrigió por el contenido de proteína de cada condición determinado mediante BCA. El fondo de radioactividad se determinó midiendo la captación de glucosa radioactiva en una solución de D-glucosa 50 mM.

22. Extracción del RNA total y reacción de transcripción inversa (RT)

El RNA total de las células 3T3-L1 se extrajo con TriReagent (Sigma) siguiendo el protocolo recomendado por la casa comercial. Una vez aislado el RNA, se cuantificó utilizando el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific). Para llevar a cabo la retrotranscripción se utilizaron 1,5 µg de RNA de cada tratamiento y 100 U de la enzima transcriptasa reversa (M-MVL-RT, Promega) en presencia de 30 U de inhibidor de ribonucleasas (RNasin, Promega), dNTPs 0,5 mM y primers oligo(dT) 20 µg/ml (Promega) como cebadores. El volumen total de la reacción fue de 20µl y se realizó a 37°C siguiendo el protocolo recomendado por Promega y se inactivó a 85°C durante 5 min.

23. RT-PCR cuantitativa a tiempo real (q-PCR)

La q-PCR se realizó utilizando el kit SYBR Green Master Mix en un termociclador LightCycler v.3.5 (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante. Mediante el uso de cebadores específicos para cada mRNA (Tabla 2) se amplificaron 2 µl de una dilución 1/100 del cDNA resultante de las reacciones de RT en un volumen final de reacción de 10 µl. Cada muestra se amplificó por duplicado y se utilizó rRNA 18S como control. La cuantificación se realizó con el programa LightCycler Relative Quantification Software (RelQant) de Roche.

Nombre	Cebador/Primer	Secuencia 5'→3'
C/EBPβ	CEBP β -sentido	GCAAGAGCCGCGACAAG
	CEBP β -antisentido	GGCTCGGGCAGCTGCTT
PPARγ	PPAR γ -sentido	GCCCACCAACTTCGGAATCAG
	PPAR γ -antisentido	CACAGACTCGGCACTCAATGGC
LXRα	LXR α -sentido	TCTGGAGACGTACAGAGGTAC
	LXR α -antisentido	TGCAGAGAAGATGCTGATGGC
18S	18S-sentido	GGGAGCCTGAGAAACGGC
	18S-antisentido	GGGTCGGGAGTGGGTAATTT

Tabla 2. Secuencia de los cebadores/primers utilizados en las reacciones de q-PCR.

24. Obtención de clones del pCycB1

El clonaje de la secuencia promotora completa del gen de la ciclina B1 se realizó previamente en nuestro laboratorio mediante amplificación por PCR utilizando unos cebadores/primers diseñados a tal efecto, clonaje en el vector PCRII (Invitrogen) y subclonaje en el vector pGL3-Basic acoplado al gen de la luciferasa (Promega).

La obtención de clones de distintas longitudes del pCycB1 se consiguió mediante deleciones parciales del pCycB1-pGL3-Basic por digestión con enzimas de restricción y el Kit ExoIII/S1 Deletion (Fermentas).

25. Mutagénesis dirigida mediante PCR

Seleccionamos el clon 5 del pCycB1 (de 237 pb) para mutar un posible elemento de respuesta para el factor de transcripción USF. Dentro de esta secuencia reducida del pCycB1 identificamos, mediante el TESS (<http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess>), una secuencia que con elevada probabilidad funcionaría como un elemento de respuesta para USF. Dicha secuencia, fue GAAGGGAGTG (Fig 12) y nos propusimos mutarla de manera que se generara una secuencia diana (AGGCCT) para la enzima de restricción *StuI* que nos permitiera identificar los clones 5 mutados (5-MUT), quedando finalmente GAAGGCCTTG. Para ello realizamos una mutagenesis dirigida mediante PCR. Este método consiste en realizar una primera PCR con cada uno de los cebadores que introducen la mutación y los cebadores del vector donde se encuentra clonada la secuencia a mutar (Fig 11). Así, se realizaron dos PCRs, una (PCR A) (Fig 11) con el cebador sentido del 5-MUT y el antisentido del vector pGL3-Basic cuya secuencia se muestra en la Tabla 3 y otra (PCR B) (Fig 11) con el cebador sentido del vector y el antisentido del 5-MUT (Tabla 3), y se obtuvieron dos fragmentos ya mutados de la secuencia (Fig 11). A continuación, la segunda PCR se realizó con los productos de las PCRs anteriores y los cebadores del vector pGL-Basic para obtener así la secuencia mutada completa (Fig 11).

Una vez amplificada esta secuencia comprobamos que, en realidad, estuviera mutada por digestión con la enzima de restricción *StuI* (Fermentas). Por último se clonó en el vector

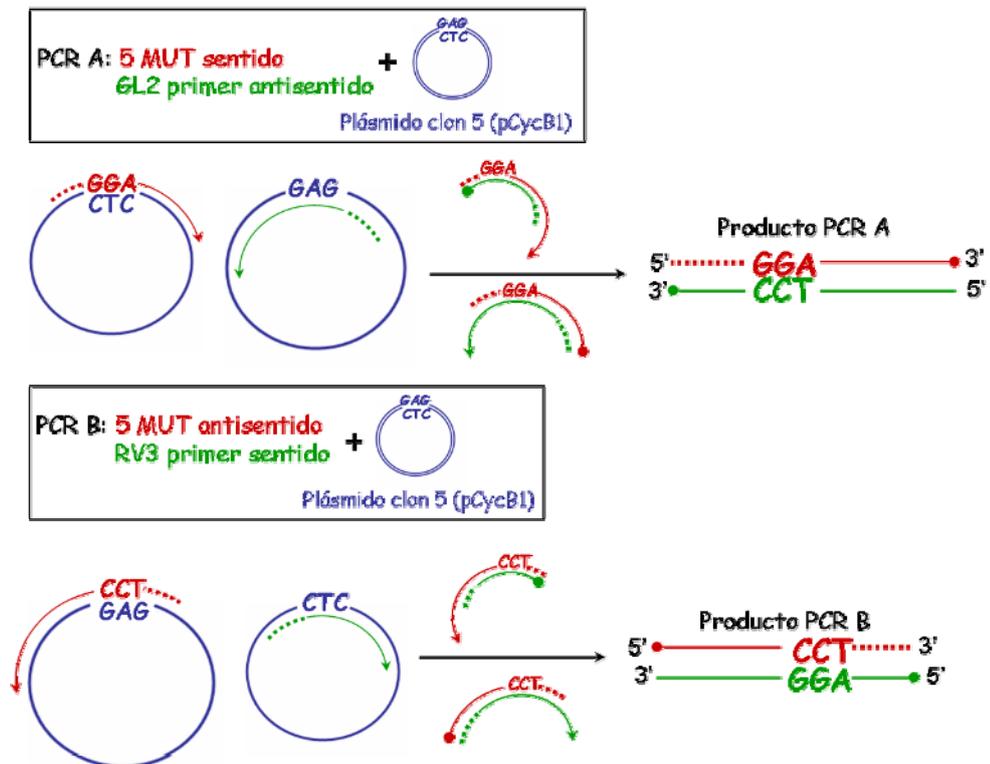
Material y Métodos

pGEM-T de Promega y se subclonó en el vector pGL3-Basic acoplado al gen de la luciferasa utilizando el kit de ligación *Fast-Link DNA Ligation Kit* de Epicentre. Este plásmido con la secuencia mutada se secuenció para confirmar definitivamente que la mutagénesis había funcionado.

Nombre	Cebador/primer sentido	Cebador/primer antisentido
5 MUT	CGCCAATGGGAAGGCCTTGAGTG	CACTCAAGGCCTTCCCATTGGCG
Vector pGL3-Basic	CTAGCAAAATAGGCTGTCCC (RV3primer)	CTTTATGTTTTTGGCGTCTTCCA (GL2primer)

Tabla 3. Secuencia de los cebadores/primers utilizados para mutagénesis dirigida mediante PCR.

1ª PCR



2ª PCR

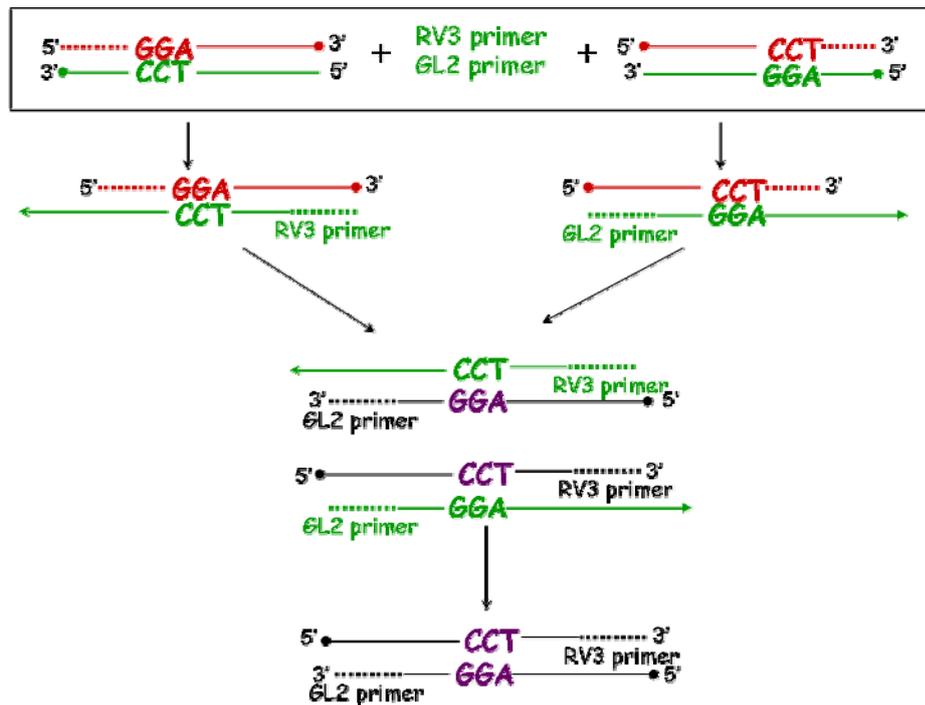


Figura 11. Mutación dirigida por PCR. Se muestran de manera esquemática las distintas reacciones de PCR que se llevan a cabo en la realización de esta técnica, las sondas utilizadas, los primers y los productos de PCR obtenidos.

26. Ensayos de actividad de promotor

Estos ensayos se realizaron en células MOLT-4 previamente transfectadas con el pCycB1, los distintos clones, y el clon 5 mutado. Para ello, se electroporaron 5×10^6 células en presencia de 10 μg de cada uno de los plásmidos objeto de estudio y 0,2 μg de Renilla a 250 V durante 10 msec en el electroporador *Electro Square Porator ECM 830* (BTX; A Division of Genetronics, INC.). Las 24 h posteriores a la electroporación las células se mantuvieron en medio RPMI sin antibióticos con LPDS al 10%. A las 24 h siguientes se sembraron a razón de 200.000 células por condición en medio RPMI con 10% de LPDS suplementado con antibióticos. Transcurrido este tiempo, las células se trataron durante 24 h se recogieron por centrifugación, se resuspendieron en el tampón de lisis del *Dual Luciferasa Kit Assay* de Promega y se congelaron a -80°C para conseguir su lisis completa.

Posteriormente se midió de manera indirecta la expresión de luciferasa (indicativo de la actividad del promotor) y de renilla, utilizando un luminómetro Sirius (Berthold detection system) y el kit *Dual Luciferasa Kit Assay* de Promega siguiendo las instrucciones del fabricante. Los valores obtenidos de la expresión de renilla se emplearon para corregir los valores de luciferasa y poder establecer comparaciones entre los distintos tratamientos y clones.

Resultados

Resultados

En estudios previos en nuestro laboratorio se ha observado la influencia del colesterol sobre la diferenciación celular en la línea promielocítica humana HL-60, en la que la inhibición de la síntesis de colesterol induce su diferenciación a neutrófilos (Sanchez-Martin et al., 2007). Durante la adipogénesis ocurre una redistribución del colesterol de membrana a las gotas lipídicas que se forman en los adipocitos, y esta alteración en la distribución del colesterol celular altera, a su vez, su sensibilidad a la insulina modificando su comportamiento metabólico (Le Lay et al., 2001). Parece que el colesterol, lejos de ser considerado como un mero componente estructural de la membrana plasmática, participa en la regulación de la fisiología celular y por ello nos planteamos estudiar el efecto de la inhibición de su síntesis en la diferenciación de células 3T3-L1 a adipocitos.

1. Efecto de la inhibición de la síntesis de colesterol sobre la diferenciación a adipocitos de células 3T3-L1

1.1. Efecto de distintos inhibidores sobre la síntesis de colesterol en células 3T3-L1

Para analizar el efecto de distintos inhibidores de la síntesis de colesterol sobre la adipogénesis analizamos, primero, el efecto que ejercían sobre la síntesis de colesterol en preadipocitos 3T3-L1. La inhibición de distintas enzimas de la colesterogénesis por parte de los inhibidores utilizados se ha comprobado previamente en otros tipos celulares como las HL-60 (Fernández Hernando, 2003), pero debíamos constatar que en las células 3T3-L1 actuaban de la misma manera. Células 3T3-L1 en fase de crecimiento se incubaron en flask de 75 cm² durante 10 horas en medio con LPDS en ausencia (células control) y en presencia de distintos inhibidores de la colesterogénesis a las siguientes concentraciones: SKF 104976 3 μ M, AY 9944 5 μ M, 5,22-colestadien-3 β -ol 1 μ g/ml y triparanol 3 μ M. A las dos horas de iniciar el tratamiento, se añadió al medio [¹⁴C]-acetato y se incubaron durante 8 horas más. La radioactividad incorporada a las distintas especies de esteroides sintetizados, así como la naturaleza de los mismos se analizó mediante HPLC en fase reversa.

Las células control sintetizaron exclusivamente colesterol a partir del acetato radioactivo (Fig 12A). La adición al medio de los inhibidores a esas concentraciones anuló completamente la incorporación de radioactividad al colesterol de nueva síntesis (Fig 12). En estos casos, el [¹⁴C]-acetato, a partir del cual se inicia la colesterogénesis, no se transforma en colesterol sino en intermediarios de la ruta debido al bloqueo que los distintos inhibidores ejercen sobre distintas enzimas. Así pues, el SKF 104976 a la concentración de 3 μ M produjo la acumulación de lanosterol y dihidrolanosterol (Fig 12A) al inhibir la lanosterol 14 α -desmetilasa. El AY 9944 5 μ M, produjo la acumulación de 7-deshidrodesmosterol (7-DHD) y 7-DHC (Fig 12A) como resultado de la inhibición de la Δ^7 -reductasa. Las células tratadas con 5,22-colestadien-3 β -ol 1 μ g/ml acumularon 7-DHD y desmosterol (Fig 12A) por la inhibición de la Δ^{24} -reductasa. Por último, los preadipocitos tratados con triparanol 3 μ M acumularon 7-DHD y zimosterol según se confirmó mediante el análisis más detallado de los esteroides acumulados por GC/MS (Fig 12B). Esto sugiere una fuerte inhibición de la Δ^{24} -reductasa, así como de la Δ^7 -reductasa y la $\Delta^{8,7}$ -isomerasa en este orden de afinidad.

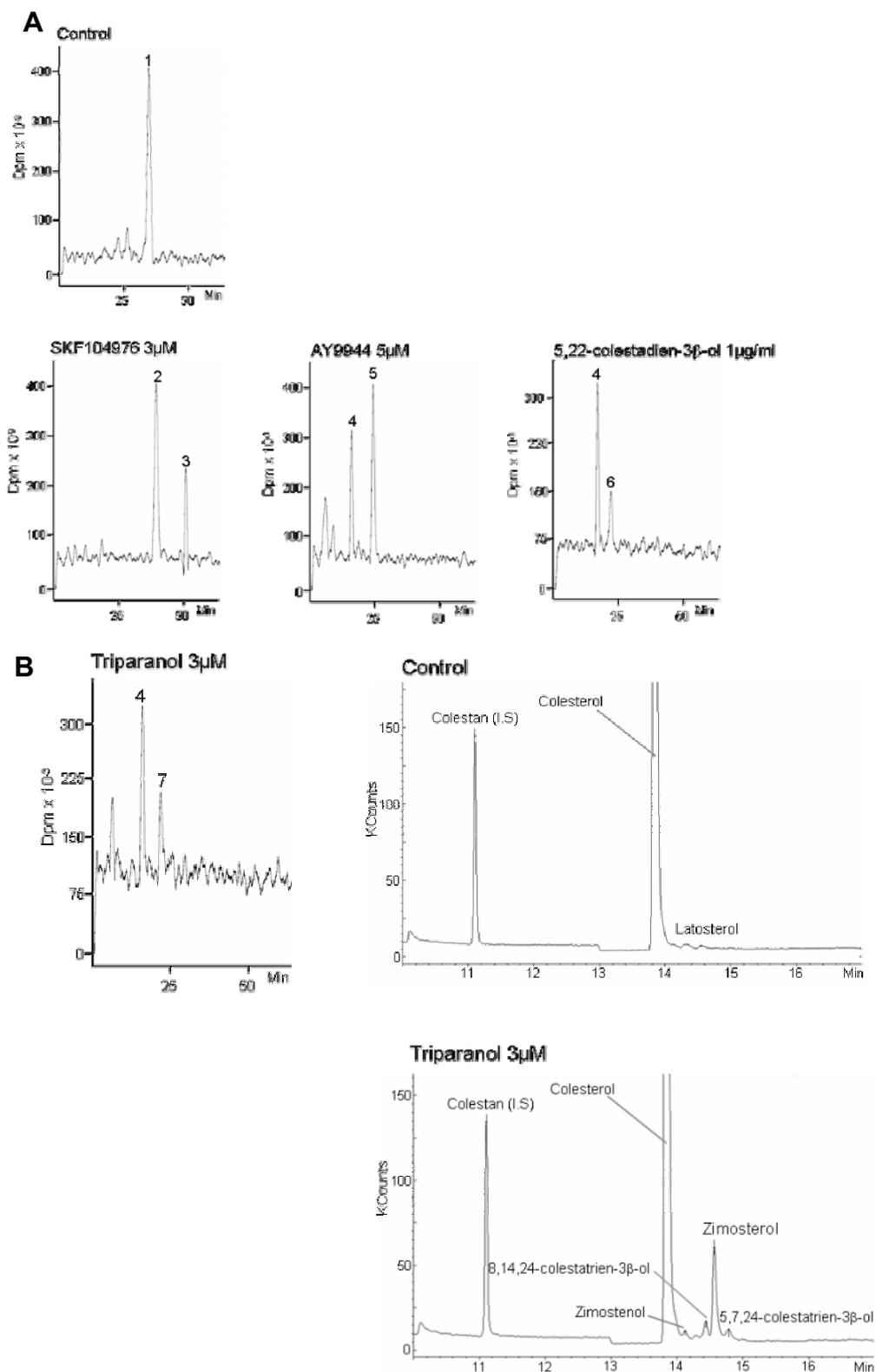


Figura 12. Efecto de distintos inhibidores de la colesterogénesis sobre la biosíntesis de colesterol en células 3T3-L1. A. Se analizó mediante HPLC la radioactividad incorporada a los distintos intermediarios de la síntesis de colesterol en preadipocitos 3T3-L1 tratados con SKF 104976 3 µM, AY 9944 5 µM y 5,22-colestadien-3β-ol 1 µg/ml. Picos identificados: (1) colesterol, (2) lanosterol, (3) dihidrolanosterol, (4) 7-DHD, (5) 7-DHC, (6) Desmosterol, (7) Zimosterol. B. El efecto del Triparanol 3 µM sobre la colesterogénesis se analizó mediante HPLC y GC/MS para una mejor identificación de los esteroides acumulados en este caso. Se muestran cromatogramas de intercambio iónico. (I.S), estándar interno: colestano.

1.2. Efectos del SKF 104976 sobre la acumulación de gotas lipídicas en células 3T3-L1

Durante la diferenciación terminal aumenta la tasa de lipogénesis y comienza la acumulación de gotas lipídicas en el citoplasma de los preadipocitos, donde se acumulan grandes cantidades de lípidos neutros como triglicéridos y ésteres de colesterol (Gregoire et al., 1998). Para estudiar el efecto del SKF 104976 sobre la diferenciación a adipocitos de las células 3T3-L1 analizamos primero su capacidad para acumular gotas lipídicas tras 5 días de haber inducido su diferenciación. Así, las células se diferenciaron en medio con FBS al 10%, o con LPDS al 10% solo (células control), con SKF 104976 3 μ M, colesterol libre o LDL-colesterol, ambos a 30 μ g/ml, o con el inhibidor tanto con colesterol libre como con LDL-colesterol a las concentraciones indicadas. El proceso de diferenciación se indujo siguiendo el protocolo descrito en Material y Métodos (apartado 4) durante 5 días. Las células indiferenciadas fueron células mantenidas en FBS hasta el momento de alcanzar la confluencia.

Tras este tiempo, se analizó la cantidad de acumulaciones lipídicas en cada caso por tinción con Oil Red-O. Aparentemente, la acumulación de gotas lipídicas en células 3T3-L1 diferenciadas en FBS, LPDS solo o con colesterol libre o en forma de LDL fue aproximadamente igual en todos los casos (Fig 13A), mientras que el SKF 104976 provocó un descenso en tales acumulaciones, imprimiendo a las células un fenotipo semejante al de células indiferenciadas (Fig 13A). Por su parte, el colesterol tanto libre como en forma de LDL evitó los efectos del SKF 104976 devolviéndole a las células el aspecto de adipocitos diferenciados (Fig 13A). Al cuantificar el contenido de las gotas lipídicas mediante la determinación de la absorbancia del Oil Red-O a 510 nm observamos más detalladamente los efectos del SKF 104976 sobre tales acumulaciones. En estos experimentos, advertimos que la absorbancia en células 3T3-L1 diferenciadas en LPDS fue menor que en las diferenciadas en medio con FBS (Fig 13B), pero muy semejante a la de células diferenciadas en LPDS con colesterol libre o en forma de LDL (Fig 13B). Esto indica que es posible que no solo el colesterol, sino algún otro componente del FBS que no se encuentra en el LPDS participe en la generación de las gotas lipídicas. El tratamiento con el inhibidor provocó un notable descenso en la absorbancia del Oil Red-O respecto a células control (Fig 13B) que aumentó, en parte, ante el aporte externo de colesterol, tanto en forma de colesterol libre como en forma de LDL-colesterol (Fig 13B). Estos resultados indican la importancia del colesterol en el proceso de adipogénesis, ya que células 3T3-L1 privadas completamente de colesterol (tratadas con SKF 104976) fueron incapaces de diferenciarse a adipocitos tras estimulación hormonal; pero en presencia de éste, se evitó el efecto del inhibidor sobre la acumulación de gotas lipídicas.

1.3. Efecto del SKF 104976 sobre el contenido de colesterol y triglicéridos en células 3T3-L1 diferenciadas

Los componentes principales de las gotas lipídicas son los triglicéridos y los ésteres de colesterol y así nos propusimos estudiar el efecto del SKF 104976 sobre el contenido de ambos en células 3T3-L1 diferenciadas. Para ello, diferenciamos células 3T3-L1 durante 5 días en medio con LPDS al 10% solo (control), con colesterol libre o en forma de LDL a la concentración de 30 μ g/ml o con el inhibidor solo o en combinación con colesterol libre o LDL-colesterol a las concentraciones indicadas. Los niveles de colesterol y triglicéridos se midieron mediante métodos enzimáticos y observamos que el SKF 104976 produjo una disminución significativa de ambos y que el tratamiento conjunto del inhibidor tanto con colesterol libre como en forma de LDL evitó el efecto del inhibidor sobre los niveles de los componentes de las gotas

lipídicas en la adipogénesis de células 3T3-L1, siendo más efectivo el colesterol libre que las LDL (Tabla 4).

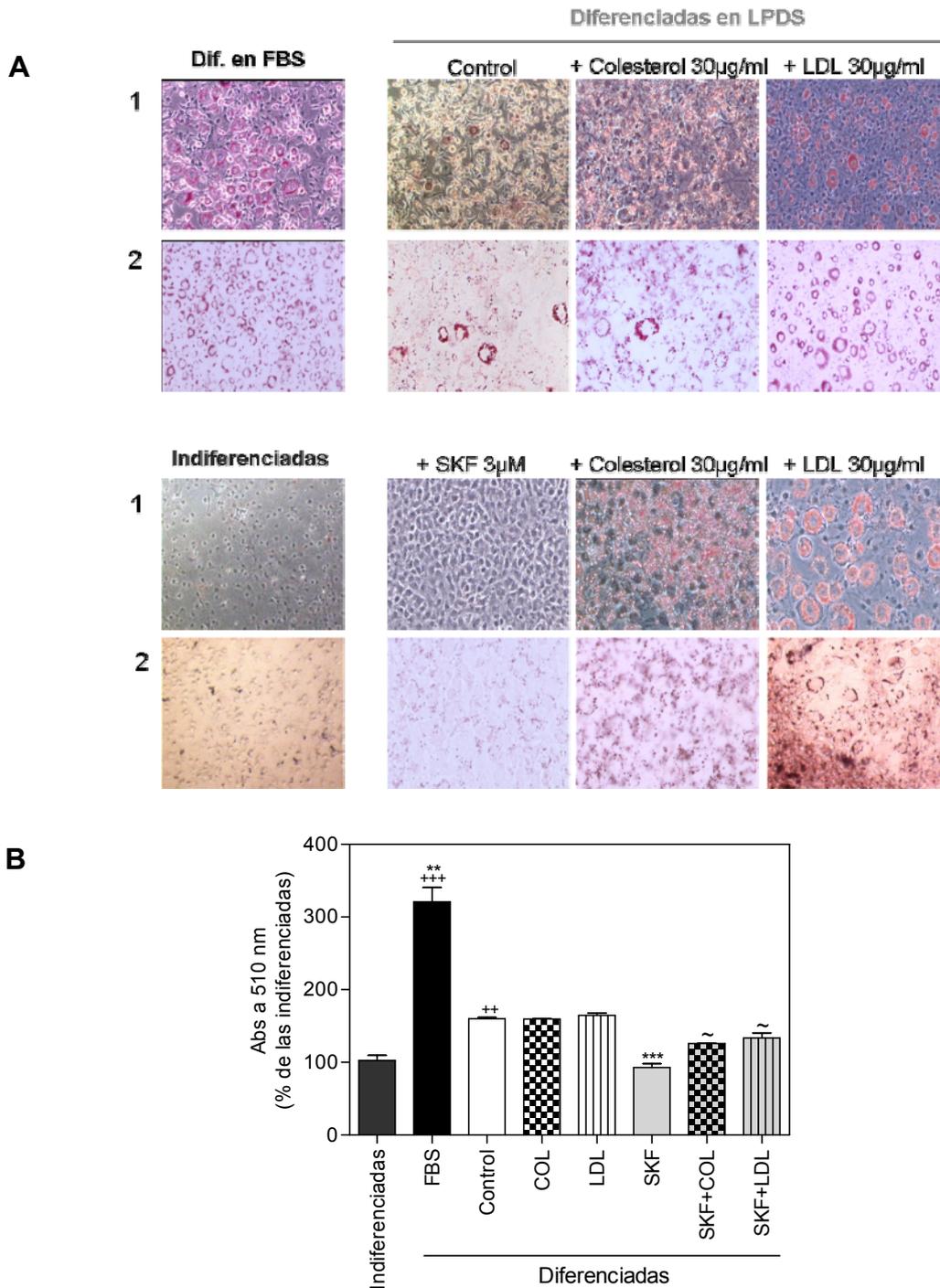


Figura 13. Efecto del SKF 104976 sobre la acumulación de gotas lipídicas durante la adipogénesis de preadipocitos 3T3-L1. A. La acumulación de lípidos neutros en las gotas lipídicas se monitorizó mediante tinción con Oil Red-O de las células 3T3-L1 en las condiciones que se indican. 1. Imágenes de microscopía de contraste de fases. 2. Imágenes de microscopía de las gotas lipídicas. B. Se muestran los valores de absorbancia a 510 nm del Oil Red-O incorporado a los lípidos neutros en cada tratamiento. Los datos se expresan como % de las células indiferenciadas y como media \pm EE (n=3). La comparación estadística se estableció respecto a las células indiferenciadas (++ $p < 0,002$, +++ $p < 0,0005$), respecto a las células control (** $p < 0,002$, *** $p < 0,0005$) y respecto a las células diferenciadas en presencia de SKF solo (~ $p < 0,01$).

	Colesterol	Triglicéridos
<i>Control</i>	22,1 ± 0,2	34,4 ± 0,4
<i>Colesterol</i>	40,1 ± 1,0	34,1 ± 0,2
<i>LDL</i>	22,3 ± 0,5	32,0 ± 0,1
<i>SKF 104976</i>	14,4 ± 0,4 **	24,5 ± 0,3 **
<i>SKF 104976 + Colesterol</i>	29,3 ± 0,8 **	30,5 ± 0,2 **
<i>SKF 104976 + LDL</i>	17,3 ± 0,8 ⁺	27,9 ± 0,1 **

Tabla 4. Efecto del SKF 104976 sobre el contenido de las gotas lipídicas en células 3T3-L1 diferenciadas. El contenido de colesterol y triglicéridos se determinó mediante métodos enzimáticos en células 3T3-L1 diferenciadas durante 5 días en las condiciones que se indican. Las células control fueron células diferenciadas en 10% de LPDS. Los datos de la tabla se expresan como μg de colesterol o triglicéridos por mg de proteína (media \pm EE, $n=3$). La comparación estadística se expresa respecto a la condición control (** $p<0,001$) o respecto al tratamiento solo con el inhibidor (SKF 104976) (⁺ $p<0,05$; ** $p<0,001$).

Ante estas observaciones de que la inhibición de la colesterogénesis impide la diferenciación de los preadipocitos 3T3-L1 a adipocitos en presencia de los estímulos adecuados, quisimos observar qué estaba ocurriendo molecularmente y para ello, comenzamos analizando la expresión de algunos de los factores de transcripción encargados de dirigir el proceso de diferenciación, así como proteínas específicas de adipocitos maduros.

1.4. Estudio del efecto de la inhibición de la síntesis de colesterol sobre la expresión de algunos factores de transcripción implicados en la adipogénesis

Analizamos los niveles de mRNA y/o proteína del primer factor expresado en el programa de diferenciación, C/EBP β , y de factores activos en etapas más avanzadas del proceso, como PPAR γ , LXR α y C/EBP α .

1.4.1. Efecto del SKF 104976 sobre la expresión de C/EBP β durante la adipogénesis de células 3T3-L1

El factor de transcripción C/EBP β es el responsable de inducir algunos de los factores de transcripción que se expresan en etapas más avanzadas y que permiten la progresión del proceso, además de ser el primero en expresarse ante la estimulación de la diferenciación de células 3T3-L1 a adipocitos (Otto and Lane, 2005). Los máximos niveles de esta proteína se detectan ya a las 4 horas de haber comenzado el proceso y se mantienen durante los dos primeros días de diferenciación descendiendo luego a la mitad en etapas más avanzadas (Cao et al., 1991; Otto and Lane, 2005; Tang and Lane, 1999). Por esto, el estudio de su expresión de mensajero y proteína se realizó en el día 1 de diferenciación en células 3T3-L1. Su expresión aumentó al inducir la adipogénesis (Fig 14A) pero la inhibición de la síntesis de colesterol por SKF 104976 3 μM no provocó descenso alguno en la expresión de mRNA (Fig 14A) ni proteína (Fig 14B) de C/EBP β .

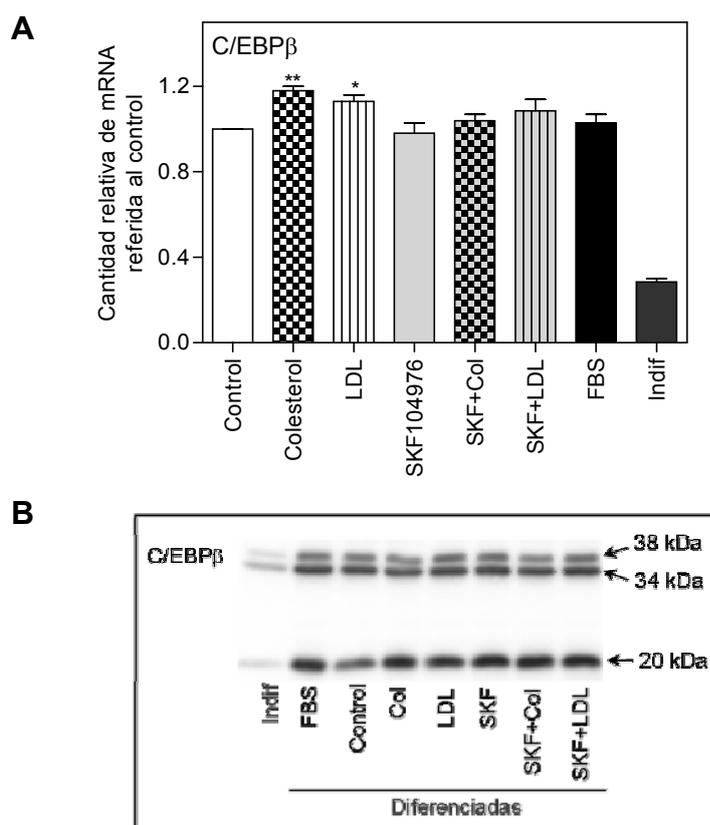


Figura 14. Efecto del SKF 104976 sobre la expresión del factor de transcripción C/EBPβ. A. Las células 3T3-L1 se diferenciaron durante 1 día en las condiciones indicadas y se analizaron, mediante q-PCR, los niveles de mRNA de C/EBPβ. Los datos se expresan como media ± EE (n=3). Las comparaciones estadísticas se realizaron frente las células control (* $p < 0,005$, ** $p < 0,001$). B. Las células 3T3-L1 se diferenciaron durante 1 día en las condiciones que se indican y se analizaron por western-blot los niveles de proteína de C/EBPβ en 50 µg de extractos proteicos nucleares. Se muestra un western-blot representativo de tres experimentos independientes.

1.4.2. Efecto del SKF 104976 sobre la expresión de PPARγ, LXRα y C/EBPα en la adipogénesis de células 3T3-L1

La disminución en la acumulación de gotas lipídicas por el tratamiento con SKF 104976 de preadipocitos en diferenciación podría deberse a alteraciones en la expresión de algunos de los factores de transcripción encargados de dirigir el proceso. Para determinar la influencia del descenso en los niveles de colesterol por inhibición de su síntesis con SKF 104976 3 µM a este respecto; las células 3T3-L1 se diferenciaron en FBS o LPDS al 10% solo (células control), con colesterol libre o LDL-colesterol ambos a la concentración de 30 µg/ml o SKF 104976 3 µM solo o en combinación con colesterol libre o LDL-colesterol. Después de cinco días de diferenciación se determinaron los niveles de mRNA y proteína de PPARγ y LXRα, así como los niveles de proteína de C/EBPα. Para ello se analizó la expresión génica de los factores indicados mediante q-PCR, normalizándose los niveles de mRNA según el contenido de rRNA 18S.

La inducción de la adipogénesis en células 3T3-L1 incubadas en FBS condujo a aumentos de dos y quince veces en los niveles de mRNA de PPARγ y LXRα, respectivamente, respecto a los de células indiferenciadas (Fig 15A y 15B). En células control, la expresión de mensajero de estos dos genes también experimentó un aumento significativo respecto a su expresión en células indiferenciadas aunque, en este caso, tal aumento no fue tan acusado

como en células diferenciadas en FBS (Fig 15A y B). El tratamiento con SKF 104976 redujo estos niveles en un 56% en el caso de PPAR γ (Fig 15A) y en un 44% en el caso de LXR α (Fig 15B) en comparación con células control, siendo estos niveles semejantes a los encontrados en células indiferenciadas. El aporte de colesterol libre o en forma de LDL contrarrestó parcialmente el efecto inhibitorio del SKF 104976 sobre la expresión en mensajero de estos factores de transcripción (Fig 15A y B). Además, incluso en células diferenciadas en presencia de FBS, el SKF 104976 fue capaz de disminuir significativamente el contenido de mRNA tanto de PPAR γ como de LXR α (Fig 15A y B), aunque esta disminución no fue tan acusada como al inhibir la síntesis de colesterol en presencia de LPDS (Fig 15A y B).

Posteriormente, quisimos determinar si el efecto observado también era provocado por otros inhibidores de la colesterogénesis (AY 9944 y atorvastatina). Los niveles de mRNA de PPAR γ en células diferenciadas en presencia de AY 9944 5 μ M o atorvastatina 5 μ M disminuyeron en un 70% y un 40%, respectivamente en comparación con células control (Fig 15C). En el caso de LXR α , el AY 9944 y la atorvastatina provocaron un descenso en la cantidad de mRNA del 68% y el 32%, respectivamente (Fig 15D). La coincubación de cada uno de los inhibidores con LDL-colesterol 30 μ g/ml evitó sustancialmente el efecto inhibitorio del AY 9944 y la atorvastatina sobre la expresión de mensajero de PPAR γ y LXR α (Fig 15C y D).

Tras estos 5 días de diferenciación también se analizaron, mediante western-blot, los niveles de proteína de PPAR γ , LXR α y C/EBP α . Observamos que el patrón de expresión de proteína de PPAR γ y LXR α para cada uno de los tratamientos va en paralelo a los resultados relativos a la expresión de mRNA. En células indiferenciadas (células mantenidas en FBS sin estimulación hormonal durante el tiempo del tratamiento no se detectó expresión de ninguno de los factores (Fig 15E). La incubación con el inhibidor provocó una disminución respecto de células control en la expresión PPAR γ , LXR α y C/EBP α (Fig 15E), y la coincubación del SKF 104976 con colesterol libre o LDL impidió el efecto del inhibidor (Fig 15E).

1.5. Efecto del SKF 104976 sobre la expresión de proteínas específicas de adipocitos en células 3T3-L1 en diferenciación

Una vez comprobado que el SKF 104976 y otros inhibidores de la biosíntesis de colesterol impiden la expresión de algunos factores de transcripción implicados en la adipogénesis, decidimos analizar la expresión de proteínas específicas de adipocitos. Las proteínas elegidas fueron la adiposina (proteína de secreción de adipocitos completamente diferenciados) y aP2/FABP4.

Se analizaron, mediante western-blot, los niveles de estas proteínas en células 3T3-L1 sometidas a 5 días de diferenciación y observamos un paralelismo entre los cambios de expresión de ambas proteínas en las distintas condiciones. Como se observa en la figura 16, tanto los niveles de adiposina como de aP2 en células indiferenciadas fueron indetectables. Estos niveles aumentaron al diferenciar las células en presencia de FBS al 10% o LPDS al 10% solo (células control) o en presencia de colesterol libre 30 μ g/ml (Fig 16). El tratamiento con SKF 104976 3 μ M disminuyó considerablemente los niveles de proteína tanto de aP2 como de adiposina, mientras que la adición conjunta de colesterol evitó el efecto del SKF 104976 y mantuvo los niveles de expresión tan aumentados como en las células control (Fig 16).

Una vez más, se deduce que es la falta de colesterol la responsable del bloqueo de la adipogénesis por inhibición de la expresión de proteínas específicas de adipocitos maduros.

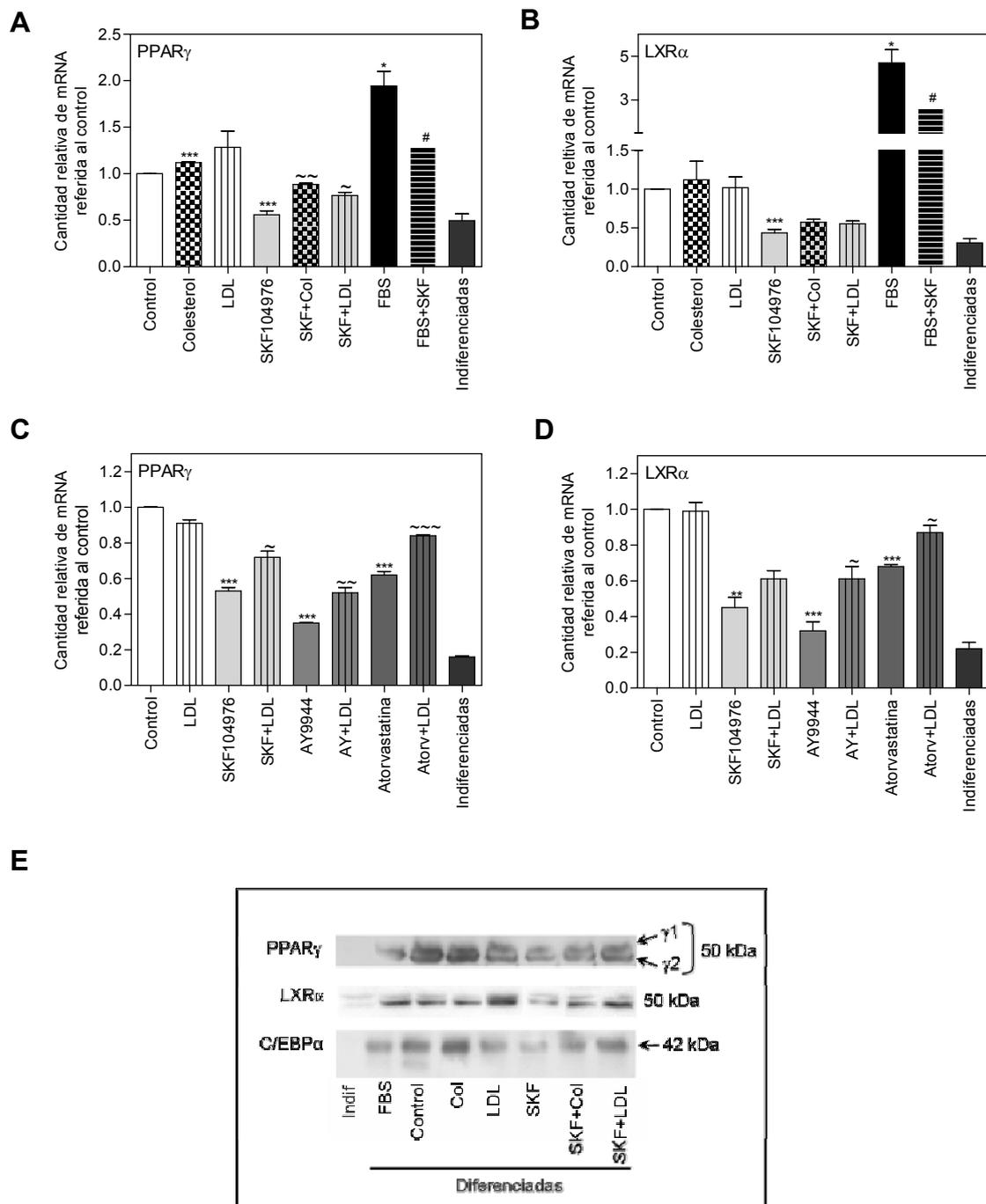


Figura 15. Efecto de los inhibidores de la colesterogénesis sobre la expresión de factores de transcripción de la adipogénesis. A, B, C y D. Las células 3T3-L1 se diferenciaron a adipocitos durante 5 días en las condiciones indicadas y se analizaron mediante q-PCR los niveles de mRNA de PPAR γ y LXR α . Los datos se expresan como media \pm EE (n=3) y las comparaciones estadísticas se realizaron respecto de las células control (* $p < 0,005$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0005$), respecto de los inhibidores solos (~ $p < 0,05$; ~ ~ $p < 0,005$) y respecto de las células diferenciadas en FBS (# $p < 0,05$). E. Las células se diferenciaron durante 5 días con los tratamientos que se indican y se analizaron los niveles de proteína de PPAR γ , LXR α y C/EBP α mediante western-blot en 50 μ g de extractos proteicos nucleares de cada tratamiento. Las imágenes de western-blot son representativas de al menos tres experimentos independientes.

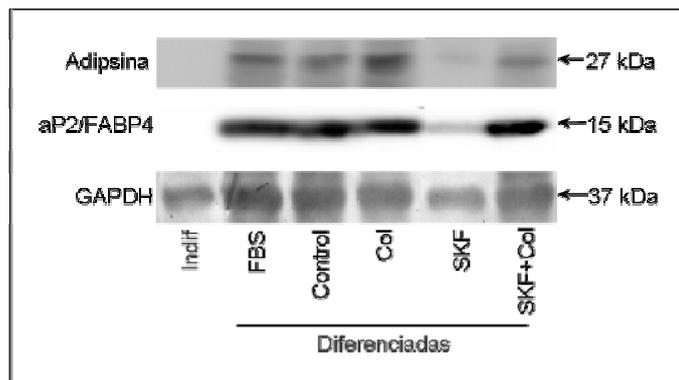


Figura 16. Efecto del SKF 104976 sobre la expresión de adipina y aP2/FABP4. Las células 3T3-L1 se diferenciaron durante 5 días con los tratamientos indicados y se analizaron, mediante western-blot, los niveles de adipina y aP2. Para ello se utilizaron 50 µg de proteína total de cada tratamiento y se detectaron los niveles de adipina, aP2 y GAPDH (control de carga). Las imágenes mostradas son representativas de tres experimentos realizados de forma independiente.

1.6. Efectos de la inhibición de la colesterogénesis sobre el ciclo celular en adipogénesis

La adipogénesis es un proceso en el que tanto cambios en la expresión génica como morfológicos y funcionales están fuertemente ligados a cambios en el ciclo celular (Fajas et al., 1998). En algunos modelos de adipogénesis, como en las células 3T3-L1, se ha observado que la inhibición de la fase de expansión clonal provoca una inhibición de la diferenciación, proponiendo esta etapa como clave para que se desarrolle el proceso (Kuri-Harcuch and Marsch-Moreno, 1983). Por otra parte, en nuestro laboratorio se ha observado el bloqueo del ciclo celular por inhibición de la síntesis de colesterol en varios tipos celulares (Martínez-Botas et al., 2001; Martínez-Botas et al., 1999). Ante estos resultados, nos propusimos estudiar posibles alteraciones en la síntesis de DNA y en la progresión del ciclo celular durante la fase de expansión clonal como causa de la inhibición de la adipogénesis por inhibición de la colesterogénesis en células 3T3-L1.

1.6.1. Determinación del momento de la diferenciación en que tiene lugar la fase de expansión clonal en células 3T3-L1

Para concretar el momento de la diferenciación en que ocurre la fase de expansión clonal en nuestro modelo, las células 3T3-L1 se diferenciaron durante distintos tiempos, se fijaron y se marcaron con yoduro de propidio para el estudio del ciclo celular. Puesto que la fase de expansión clonal tiene lugar en torno a las 16-20 h después de haber inducido la diferenciación, los tiempos elegidos fueron 18, 24 y 40 h. El tiempo 0 lo representan células procesadas en el momento en que se indujo la diferenciación.

Del análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo observamos que a las 18 h, la mayoría de las células se encontraban en fase S, con un contenido intermedio de DNA, mientras que a las 24 h estaban en G2 (contenido de DNA 4n) y a la 40 h ya habían concluido un ciclo de división hallándose, por tanto, en fase G1 (contenido de DNA 2n) (Fig 17). Por tanto, fijamos las 18-20 h de diferenciación como el momento en que la mayoría de las células en cultivo está en fase S, es decir, de expansión clonal.

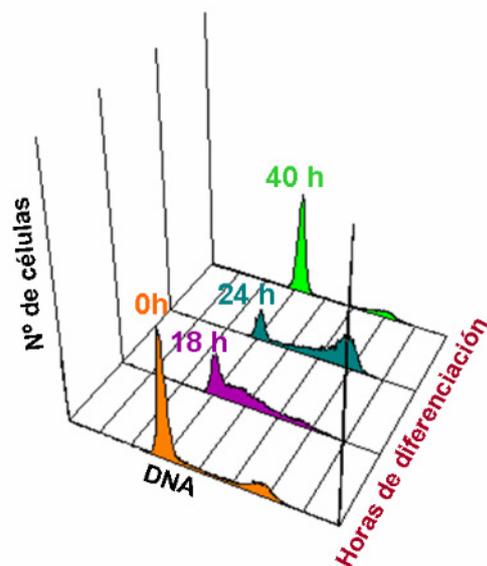


Figura 17. Determinación del momento de la diferenciación en que tiene lugar la fase de expansión clonal en células 3T3-L1. Las células 3T3-L1 se diferenciaron durante 18, 24 y 40 h y se analizó el ciclo celular mediante citometría de flujo. El diagrama es representativo de tres experimentos independientes.

1.6.2. Efecto de distintos inhibidores de la colesterogénesis sobre la síntesis de DNA durante la fase de expansión clonal en células 3T3-L1 en diferenciación

Una vez fijado el momento en que tiene lugar la fase de expansión estudiamos el efecto de distintos inhibidores de la colesterogénesis sobre el ciclo celular y la síntesis de DNA a las 20 horas de diferenciación mediante análisis bivalente en el citómetro de flujo. Las células 3T3-L1 fueron diferenciadas en presencia de BrdU 10 μ M en LPDS solo (control) o con distintos inhibidores de la colesterogénesis (SKF 104976 3 μ M, AY 9944 5 μ M y Triparanol 3 μ M) en ausencia o presencia de colesterol libre 30 μ g/ml. Transcurrido este tiempo, las células se marcaron con yoduro de propidio para analizar su distribución en las distintas fases del ciclo celular y con anti-BrdU-FITC para la detección de la BrdU incorporada al DNA de nueva síntesis. En la figura 18 observamos que ninguno de los inhibidores afectó la fase de síntesis ni bloqueó el ciclo celular en preadipocitos 3T3-L1 en diferenciación. Las células indiferenciadas fueron células mantenidas en medio con FBS sin estimulación hormonal durante las 20 h de tratamiento (Fig 18).

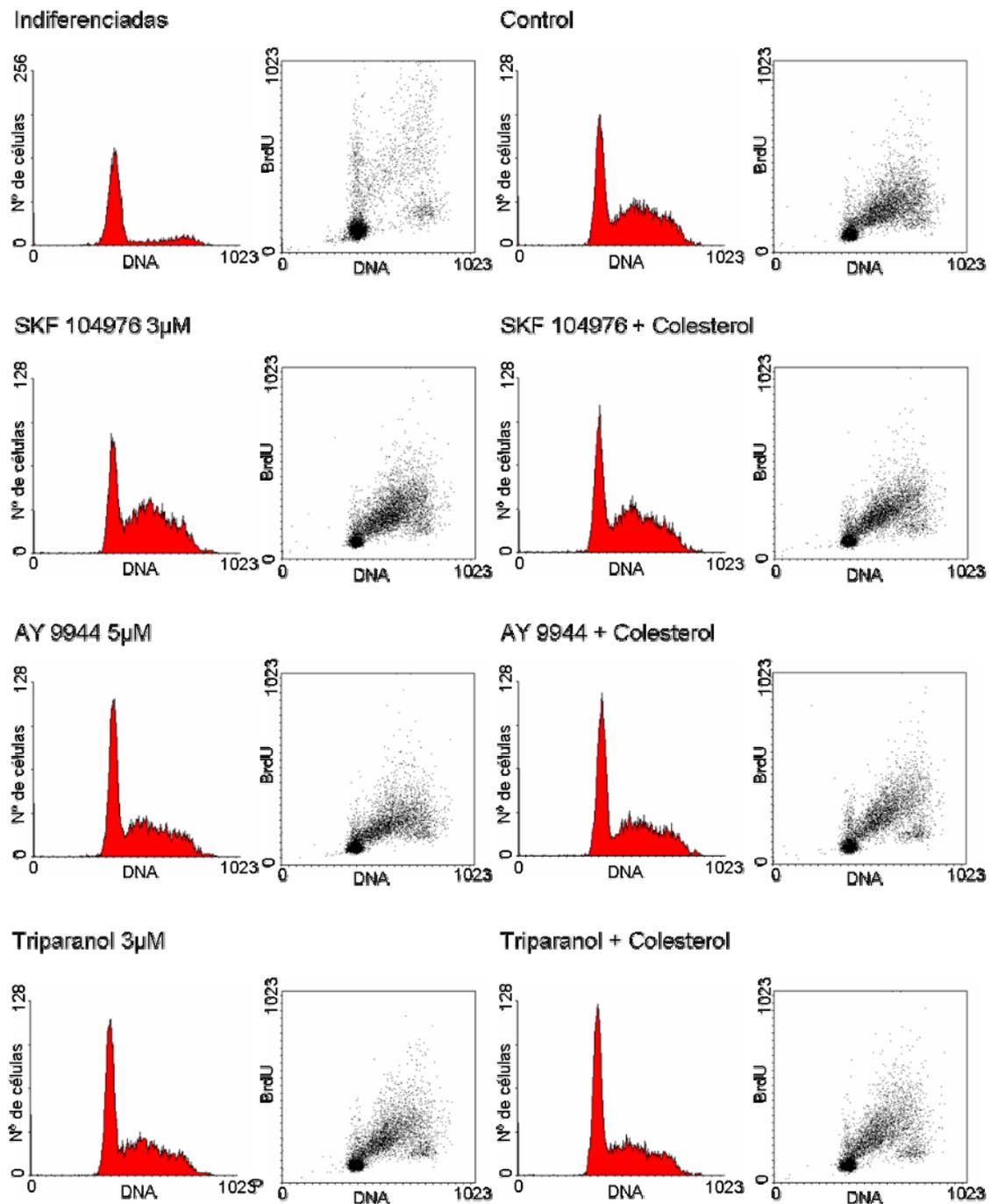


Figura 18. Efecto de la inhibición de la colesterogénesis sobre la síntesis de DNA en células 3T3-L1 en diferenciación. Las células 3T3-L1 se diferenciaron durante 20 h en presencia de BrdU en las condiciones indicadas y se analizó mediante citometría de flujo la síntesis de DNA y la fase del ciclo celular en que se encuentran las células. A la izquierda de cada tratamiento se muestra la distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular y a la derecha aparecen las células con distinto contenido de DNA y la cantidad de BrdU incorporada por cada célula. Los diagramas son representativos de tres experimentos independientes.

1.6.3. Efectos del AY 9944 sobre la progresión del ciclo celular durante la diferenciación de células 3T3-L1 a adipocitos

Una vez comprobado que la inhibición de la colesterogénesis no inhibe la síntesis de DNA durante la fase de expansión clonal ni provoca un bloqueo del ciclo celular en este momento de la adipogénesis, quisimos analizar el transcurso del ciclo celular en periodos más largos de la diferenciación y si la expansión clonal concluye con éxito ante una inhibición de la colesterogénesis.

Para ello analizamos el ciclo celular mediante citometría de flujo a distintos tiempos después de haber inducido la diferenciación: 10, 24, 30, 36, 48 y 56 horas. Las células 3T3-L1 se diferenciaron en LPDS en ausencia (control) o en presencia de AY 9944 5 μ M durante los tiempos indicados y se procesaron para el análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo. A ninguno de los tiempos analizados se observaron cambios en el ciclo celular entre las células diferenciadas en presencia del inhibidor respecto a las células control (Fig 19). Además, observamos que las células 3T3-L1 sólo realizaban una ronda de división durante la fase de expansión clonal, puesto que después de la primera división, transcurridas aproximadamente 20 h (desde las 36 a las 56 h), las células en G1 no inician una nueva fase de síntesis (Fig 19). Las células indiferenciadas fueron células mantenidas en FBS y analizadas 72 h después de haber alcanzado la confluencia, momento que se corresponde con las 24 h de diferenciación de las células tratadas (Fig 19).

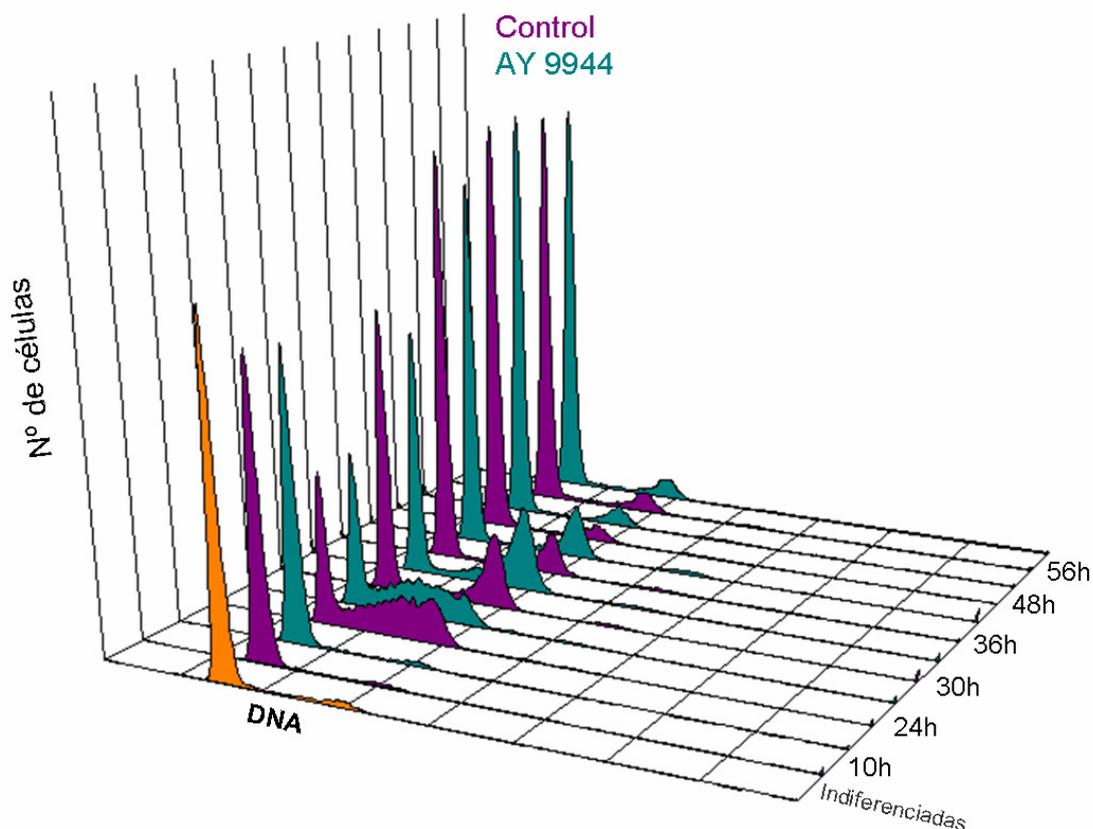


Figura 19. Efecto del AY 9944 sobre la progresión del ciclo celular durante la adipogénesis de células 3T3-L1. Las células 3T3-L1 se diferenciaron durante los tiempos indicados en LPDS solo (control) o en presencia de AY 9944 y se analizó su distribución en las distintas fases del ciclo celular mediante citometría de flujo. Las células indiferenciadas fueron células mantenidas en LPDS durante las 72 h posteriores al momento en que alcanzan la confluencia. Los perfiles de ciclo que se muestran son representativos de tres experimentos independientes.

A diferencia de lo observado en las líneas celulares HL-60 y MOLT-4 (Martinez-Botas et al., 1999; Sanchez-Martin et al., 2007), la reducción de los niveles de colesterol por efecto de distintos inhibidores no produjo alteraciones importantes en la progresión del ciclo celular en las células 3T3-L1 en diferenciación. Esto puede deberse a que el contenido de colesterol de las células 3T3-L1 es superior que en esas otras células, y puede ser suficiente como para permitir que se produzcan 1 ó 2 ciclos celulares aun cuando la biosíntesis de colesterol esté inhibida. En cualquier caso, estos resultados invalidan la hipótesis de que la causa del bloqueo de la adipogénesis por inhibición de síntesis de colesterol sea la inhibición del ciclo celular, es decir, la alteración de la expansión clonal.

Ante estas observaciones, nos planteamos que la inhibición de la colesterogénesis podría estar afectando a las vías de señalización celular e, indirectamente, a la activación de los factores de transcripción cuya expresión se ve disminuida al inhibir la síntesis de colesterol. El hecho de que estímulos adipogénicos activen típicamente distintas vías de señalización plantea su posible implicación en el proceso. Tal es el caso de las vías de Akt (Xu and Liao, 2004), y de las MAPKs (Engelman et al., 1998; Huo et al., 2003), cuya actividad en presencia de inhibidores de la colesterogénesis nos propusimos estudiar a continuación.

1.7. Efecto de la inhibición de la colesterogénesis mediada por SKF 104976 y AY 9944 sobre la funcionalidad de la vía de ERK y p38 MAPKs en la inducción de la adipogénesis de células 3T3-L1

Las MAPKs se activan en los primeros minutos después de inducir la diferenciación, pero para establecer concretamente el momento en que deberíamos estudiar su actividad diferenciamos las células 3T3-L1 durante 10 y 30 min o 1 h en LPDS solo (control) o con SKF 104976 3 μ M y analizamos, mediante western-blot, los niveles de proteína fosforilada y total de ERK1/2 y p38 (Fig 20A). Resultó que la fosforilación de ERK1/2 (p-ERK) se detectó exclusivamente a los 10 min tanto en células control como en células tratadas con SKF 104976 (Fig 20A), mientras que la de p38 se detectó ya a los 10 min y se mantuvo hasta 1 h después de inducir la diferenciación (Fig 20A). Por tanto, para facilitar el procesamiento de las muestras realizamos el análisis de ambas proteínas a los 10 min de inducir la diferenciación.

Posteriormente, nos preguntamos qué estímulos del medio de diferenciación provocaban la fosforilación de cada una de las MAPKs objeto de estudio o si era la acción conjunta de los tres la responsable de tal fosforilación. Como se muestra en la Fig 20B, todos ellos por separado indujeron la fosforilación de ERK1/2 y de p38, pero más intensamente cuando se añadieron conjuntamente al medio. Por tanto, en estudios posteriores estimulamos ambas vías con los tres agentes adipogénicos en combinación.

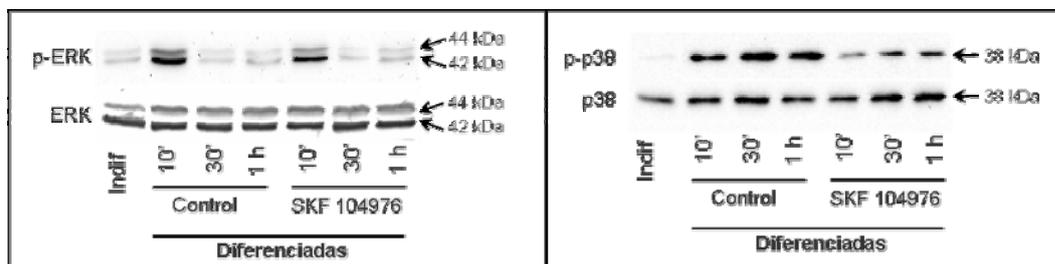
Para el estudio del efecto de los inhibidores de la colesterogénesis, SKF 104976 y AY 9944, sobre la funcionalidad de las vías de estas MAPKs se indujo la diferenciación de células 3T3-L1 en 10% de LPDS solo (células control), con colesterol libre 30 μ g/ml, o con SKF 104976 3 μ M, o AY 9944 5 μ M solos o en compañía de colesterol a las concentraciones indicadas. A los diez minutos se analizaron los niveles de fosforilación de ERK1/2 y p38, representativos de los niveles de activación y funcionalidad de ambas rutas de señalización (Fig 20C).

En células indiferenciadas (células mantenidas en LPDS 10% el tiempo que duró el experimento) los niveles de proteína fosforilada fueron indetectables o muy bajos (Fig 20C). Tanto en el caso de ERK1/2 como de p38 MAPK, los niveles de proteína fosforilada disminuyeron respecto a los de células control al inducir la diferenciación en presencia de los inhibidores (Fig 20C) y en ambos casos, el tratamiento conjunto de cada inhibidor con colesterol libre impidió la disminución en los niveles de fosforilación de ERK1/2 y p38 MAPK observada en presencia de los inhibidores (Fig 20C). Los niveles totales de ERK1/2 y p38 MAPK y GAPDH (control de carga) no se vieron afectados en ninguno de los casos (Fig 20C).

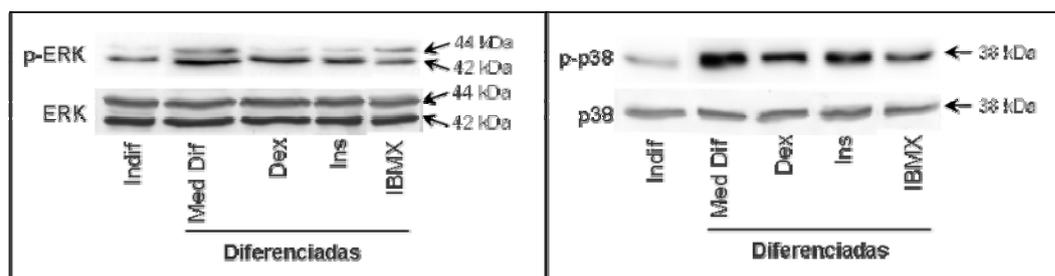
Resultados

De estos resultados deducimos que la inhibición de la síntesis de colesterol altera la activación de la vía de ERK1/2 y de p38 MAPK en el momento en que se induce la adipogénesis en células 3T3-L1.

A



B



C

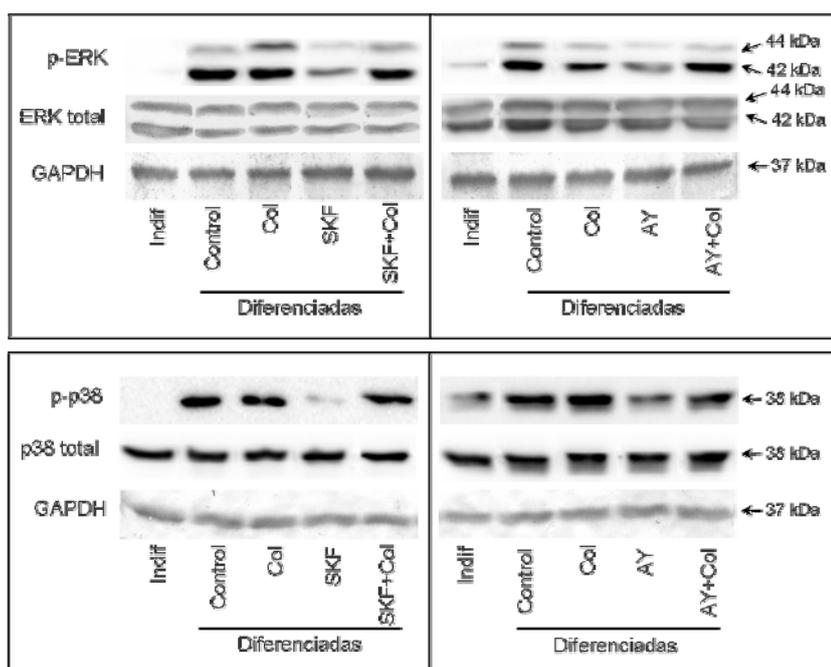


Fig 20. Efecto de los inhibidores de la síntesis de colesterol, SKF 104976 y AY 9944, sobre la actividad de las vías de las MAPKs durante la diferenciación de células 3T3-L1. A. Las células 3T3-L1 se diferenciaron durante 10, 30 minutos o 1 h en LPDS solo (control) o con SKF 104976. B. Las células 3T3-L1 se trataron durante 10 min con los tres estímulos adipogénicos juntos o por separado. C. Las células 3T3-L1 se diferenciaron durante 10 min en LPDS solo (células control), con colesterol 30 µg/ml, o con SKF 104976 3 µM o AY 9944 5 µM solos o con colesterol. En todos los casos, los niveles de p-ERK1/2, p-p38, ERK1/2 total, p38 total y GAPDH (control de carga) se analizaron mediante western-blot en 100 µg de proteína total para cada uno de los tratamientos. Indif, células indiferenciadas; Col, colesterol; Med Dif, medio de diferenciación; Dex, dexametasona; Ins, insulina; IBMX, isobutilmetilxantina. Las imágenes de western-blot que se muestran son representativas de al menos tres experimentos realizados de manera independiente.

1.8. Implicación de la vía de JNK MAPK en la diferenciación de las células 3T3-L1 a adipocitos

Los intentos por detectar la quinasa JNK1/2 fosforilada en células 3T3-L1 sometidas a las condiciones del apartado anterior (1.7) fueron infructuosos. Ante datos que apuntan a los efectos negativos de esta proteína sobre el correcto desarrollo de la adipogénesis (Camp et al., 1999), comprobamos su fosforilación en distintos momentos de la diferenciación. Por ello, diferenciamos las células 3T3-L1 en LPDS durante 15 h, 1, 2 y 6 días o durante 10 minutos con anisomicina 50 ng/ml como control positivo y analizamos, mediante western-blot, los niveles de JNK1/2 total y fosforilada. Las células indiferenciadas fueron células 3T3-L1 procesadas al alcanzar la confluencia. En ninguno de los tiempos analizados detectamos fosforilación de JNK (Fig 21), determinando que esta proteína no participa en la inducción de la adipogénesis en células 3T3-L1.

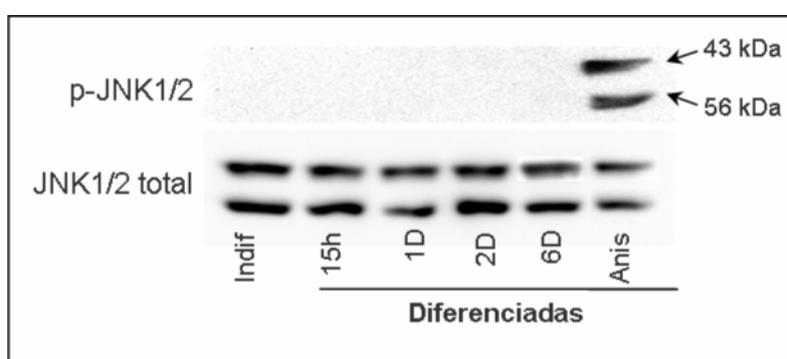


Figura 21. Papel de la JNK MAPK en adipogénesis. Western-blot de p-JNK 1/2 y JNK total en células 3T3-L1 diferenciadas en LPDS durante los tiempos indicados y con anisomicina 50 ng/ml durante 10 minutos para estimular fosforilación de JNK1/2. Las células indiferenciadas fueron células 3T3-L1 procesadas al alcanzar la confluencia. Las imágenes que se muestran son representativas de tres experimentos independientes. Anis, anisomicina; Indif, indiferenciadas.

1.9. Efecto de los inhibidores de la colesterogénesis, SKF 104976 y AY 9944, sobre la funcionalidad de la vía de PKB/Akt en la inducción de la adipogénesis en células 3T3-L1

En cuanto a la fosforilación y, por tanto, activación de la quinasa PKB/Akt durante la adipogénesis de células 3T3-L1 sabemos que se detecta ya a los 20 minutos de inducir la diferenciación y que el estímulo responsable de tal fosforilación es exclusivamente la insulina administrada a la concentración de 1 μ M (Xu and Liao, 2004). Por ello, para el estudio de su actividad y funcionalidad estimulamos la vía con insulina 1 μ M (Xu and Liao, 2004) durante 20 minutos en células 3T3-L1 incubadas en FBS o LPDS al 10% solo (células control), con colesterol 30 μ g/ml, o con los inhibidores SKF 104976 3 μ M o AY 9944 5 μ M solos o en combinación con colesterol. Los niveles de fosforilación de Akt disminuyeron con ambos inhibidores respecto de las células control (Fig 22). El tratamiento conjunto de cada uno de los inhibidores con el colesterol evitó tales efectos (Fig 22). El tratamiento con SKF 104976 o AY 9944 redujo los niveles de p-Akt y, por tanto, la estimulación de la vía de PKB/Akt por parte de la insulina, uno de los estímulos inductores de la adipogénesis y responsable de la activación de las vías de señalización implicadas en desencadenar el proceso.

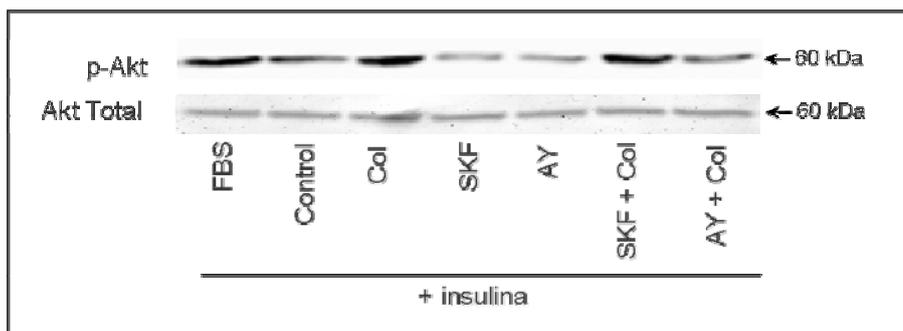


Figura 22. Efecto de los inhibidores de la colesterogénesis, SKF 104976 y AY 9944, sobre la activación de la vía de PKB/Akt en células 3T3-L1 estimuladas con insulina. La vía de PKB/Akt se estimuló con insulina 1 μ M durante 30 minutos en preadipocitos 3T3-L1 en las condiciones que se indican y se analizaron mediante western-blot los niveles de p-Akt y Akt total en 100 μ g de proteína celular total. Col, colesterol; SKF, SKF 104976 3 μ M; AY, AY 9944 5 μ M. Las células control son células estimuladas con insulina en LPDS al 10%. Las imágenes de western-blot que se muestran son representativas de al menos tres experimentos independientes.

1.10. Efecto de la inhibición de la colesterogénesis sobre la fosforilación de C/EBP β

Algunas de las vías de señalización alteradas por la inhibición de la colesterogénesis se han implicado en la fosforilación de C/EBP β , factor que sólo adquiere la capacidad de unión a DNA cuando se encuentra fosforilado (Otto and Lane, 2005; Tang et al., 2005). Dichas fosforilaciones son secuenciales; la primera, en Thr188, por acción de una MAPK, ocurre en las primeras 4 horas de diferenciación y parece ser necesaria para la expansión clonal y, aunque no suficiente, también para la unión de C/EBP β al DNA y la expresión de factores implicados en la diferenciación terminal (Piwien-Pilipuk et al., 2001; Tang et al., 2005).

En primer lugar, nos propusimos el estudio de la fosforilación en Thr188 del C/EBP β en situaciones de inhibición de la colesterogénesis, en las que ya observamos ausencia de cambios en su expresión; y después la posible implicación de las vías de señalización cuya actividad se ve disminuida con los inhibidores de la síntesis de colesterol al inducir la adipogénesis en células 3T3-L1.

1.10.1. Efecto de la inhibición de la síntesis de colesterol sobre la fosforilación en Thr188 de C/EBP β durante la adipogénesis de células 3T3-L1

Según lo descrito en la literatura, la primera de las fosforilaciones que experimenta C/EBP β durante la adipogénesis ocurre durante las primeras 4h de diferenciación en células 3T3-L1 (Tang et al., 2005). Para poder estudiar el efecto de la inhibición de la colesterogénesis sobre esta fosforilación al inducir la adipogénesis, quisimos determinar exactamente el momento en que ocurría dicha fosforilación en nuestro modelo celular. Para ello, diferenciamos los preadipocitos 3T3-L1 durante 2, 4 y 6 h, y se analizaron los niveles de p-C/EBP β (C/EBP β fosforilado en Thr188). La fosforilación de C/EBP β en Thr188 se observó ya a las 4 h de diferenciación, mientras que los niveles de C/EBP β total no variaron entre ninguno de los tiempos analizados (Fig 23A).

Puesto que no observamos alteraciones en la expresión de C/EBP β por acción del SKF 104976 nos planteamos que la inhibición de la síntesis de colesterol, lejos de afectar la expresión de C/EBP β , estuviera afectando su capacidad de unión al DNA y, por tanto, su funcionalidad, por inhibición de la fosforilación en Thr188 a través de la alteración de las vías

de señalización implicadas en dicho proceso. Para ello diferenciamos células 3T3-L1 en LPDS al 10% en ausencia (células control) y presencia de tres inhibidores de la colesterogénesis: SKF 104976 3 μ M, AY 9944 5 μ M y Triparanol 3 μ M durante 4 h. Todos los inhibidores, en mayor o menor medida, provocaron una disminución en los niveles de p-C/EBP β (Thr188) respecto a los observados en la situación control, sin observarse cambios en los niveles de expresión de proteína total (Fig. 23B).

Para proseguir en este estudio nos centramos en los efectos del AY 9944, pues fue el inhibidor de la colesterogénesis más eficaz a la hora de disminuir los niveles de fosforilación de C/EBP β durante la adipogénesis. Para demostrar que en realidad era la inhibición de colesterol la responsable de tal efecto, diferenciamos las 3T3-L1 en 10% de LPDS solo (células control) o con AY 9944 5 μ M solo o en combinación con colesterol libre 30 μ g/ml durante 4 h y entonces, analizamos los niveles de p-C/EBP β (Thr188) y C/EBP β total. Como ya habíamos visto, el tratamiento con AY 9944 5 μ M disminuyó los niveles de fosforilación de C/EBP β respecto a células control sin afectar los de proteína total (Fig 23C), pero en presencia de colesterol fue incapaz de ejercer tales efectos inhibitorios sobre la fosforilación de C/EBP β (Fig 23C). Esto indica que la reducción en los niveles de colesterol es el factor responsable de la disminución en la fosforilación de C/EBP β .

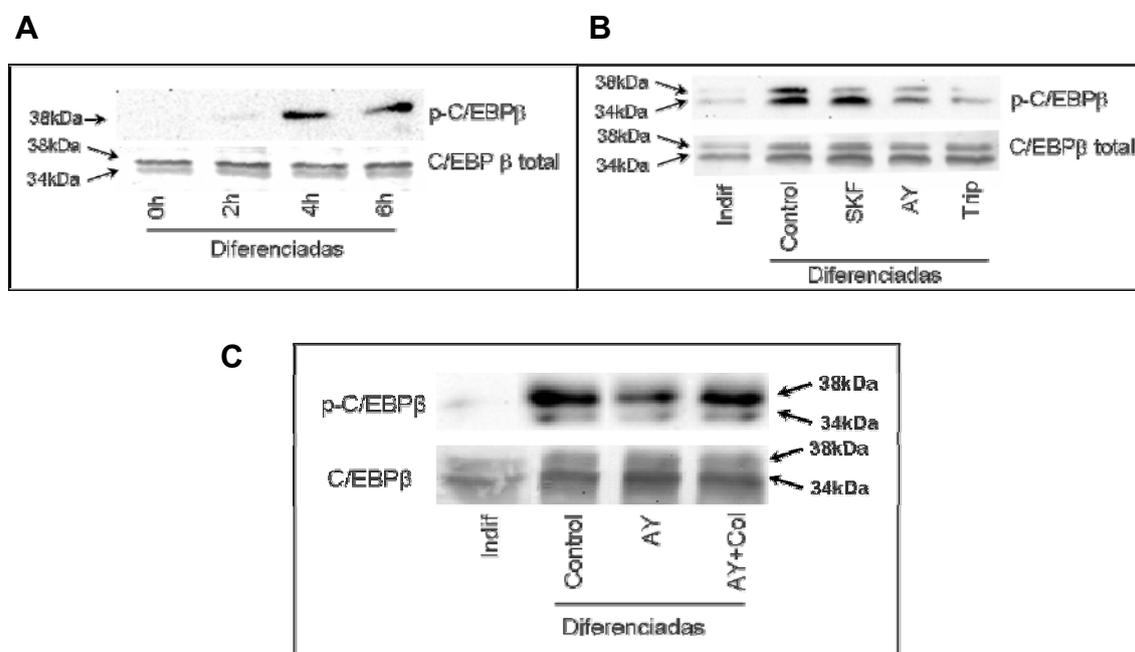


Figura 23. Efecto de la inhibición de la síntesis de colesterol sobre la fosforilación de C/EBP β durante las primeras etapas de la adipogénesis de células 3T3-L1. Western-blot de p-C/EBP β y C/EBP β total. A. Las células 3T3-L1 se diferenciaron durante 2, 4 y 6 horas. B. Las células 3T3-L1 se diferenciaron durante 4 horas en presencia de distintos inhibidores de la colesterogénesis (SKF 104976 3 μ M, AY 9944 5 μ M y triparanol 3 μ M). C. Las células 3T3-L1 se diferenciaron durante 4 horas en LPDS solo (control) o con AY 9944 5 μ M solo o en combinación con colesterol. En todos los casos, se analizó, mediante western-blot, la fosforilación en Thr188 C/EBP β y los niveles de C/EBP β total en 50 μ g de extracto proteico nuclear. Trip, triparanol; Col, colesterol; Indif, células indiferenciadas. Los western-blots son representativos de al menos tres experimentos independientes.

1.10.2. Efecto del AY 9944 sobre la fosforilación de C/EBP β ante la estimulación de distintas vías de señalización

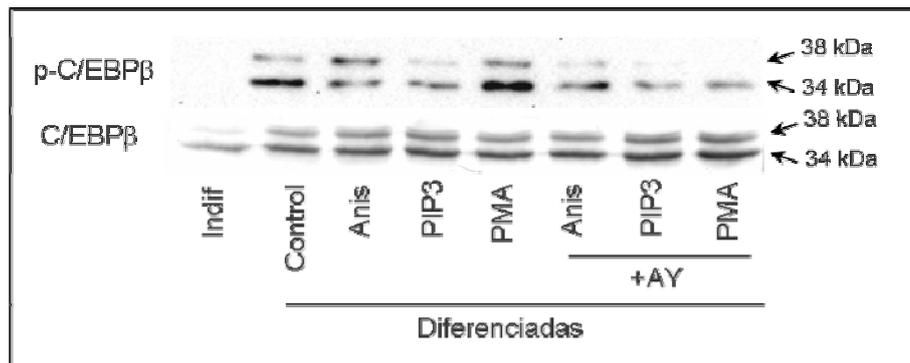
Para estudiar la implicación de las vías de señalización afectadas durante la inducción de la adipogénesis por inhibición de la síntesis de colesterol, diferenciamos células 3T3-L1 durante 4 h en LPDS al 10% solo (células control), o con activadores de la vía de p38 MAPK (anisomicina 50 ng/ml), de la vía de ERK1/2 (PMA 50 ng/ml) y de la vía de PKB/Akt (PIP3 50 ng/ml) solos o en combinación con AY 9944 5 μ M y se analizaron mediante western-blot los niveles de p-C/EBP β y proteína total. De los tres activadores utilizados, sólo el PMA aumentó los niveles de fosforilación de C/EBP β respecto a las células control (Fig 24A) mientras que en presencia del inhibidor AY 9944 no fue capaz de mantener este aumento de fosforilación (Fig 24A).

Para comprobar que, efectivamente, los activadores estimulaban las vías de señalización correspondientes y que el AY 9944 afectaba dicha activación pretratamos las células 3T3-L1 con AY 9944 5 μ M durante 24 h tras un día de haber alcanzado la confluencia y posteriormente indujimos su diferenciación en LPDS al 10% solo (células control) y con cada uno de los activadores en ausencia o en presencia de AY 9944 5 μ M durante 10 minutos para el análisis de la vía de las MAPKs (ERK1/2 y p38), y durante 30 minutos para el análisis de la vía de PKB/Akt. Se obtuvieron resultados diferentes para las distintas proteínas de señalización estudiadas: en todos los casos los activadores correspondientes aumentaron los niveles de fosforilación de ERK1/2, p38 y PKB/Akt sin afectar los niveles de proteína total. En el caso de ERK1/2 y PKB/Akt, el PMA y el PIP3, respectivamente, fueron incapaces de mantener dicha activación, que incluso disminuyó respecto a la observada en células control si los activadores se encontraban en presencia de AY 9944 (Fig 24B). En presencia de anisomicina, el AY 9944 no fue capaz de disminuir los niveles de p-p38 (Fig 24B). Todos estos resultados nos permiten afirmar que la vía afectada por la inhibición de la síntesis de colesterol provocada por el AY 9944 5 μ M y responsable de la inhibición de la fosforilación de C/EBP β en Thr188 es la vía de ERK1/2 MAPK, puesto que es la única en la que el AY9944 provoca una disminución de su actividad y de los niveles de p-C/EBP β aún ante estimulación de la misma (Fig 24B).

Una vez conocida la causa por la que la inhibición de la síntesis de colesterol altera la adipogénesis, que no es otra que la inhibición de la fosforilación de C/EBP β por inhibición de la vía de ERK; nos planteamos la búsqueda del mecanismo que relacionara una disminución en el contenido del colesterol celular provocado por la inhibición de su síntesis y la alteración de la vía de ERK.

Se sabe que en los "lipid rafts" se concentran gran parte de moléculas de señalización como el receptor de insulina (Karlsson et al., 2004; Nystrom et al., 1999). Puesto que la insulina es uno de los estímulos adipogénicos capaz de activar la vía de ERK, pensamos en la posibilidad de que la inhibición de la síntesis de colesterol estuviera alterando la estructura de estos microdominios de membrana denominados "lipid rafts", así como la señalización que media el receptor de insulina localizado en estas regiones.

A



B

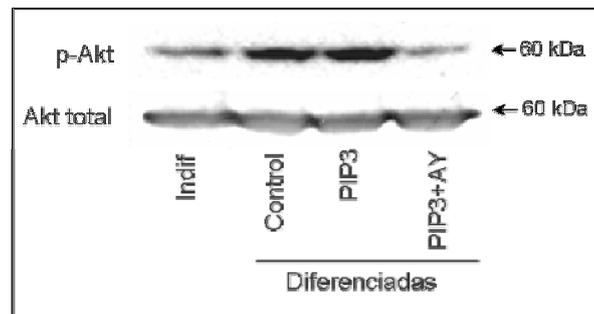
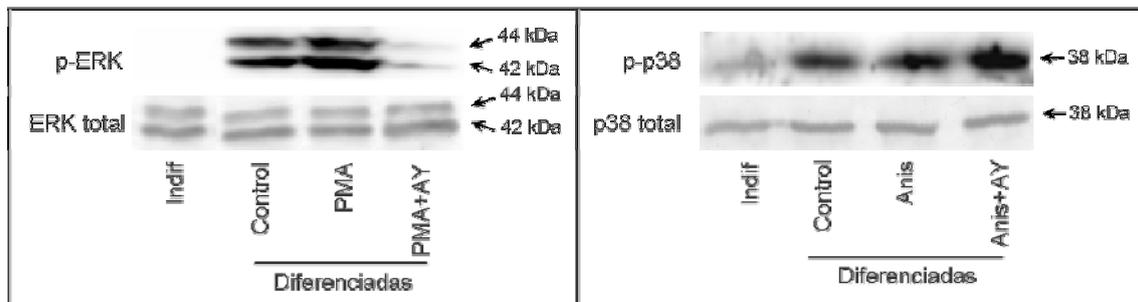


Figura 24. Efecto del AY 9944 sobre la posible señalización implicada en la fosforilación de p-C/EBP β . A. Las células 3T3-L1 se diferenciaron en LPDS durante 4 h con los tratamientos que se indican y se analizaron mediante western-blot los niveles de p-C/EBP β y C/EBP β total en 50 μ g de extracto proteico nuclear. B. Las células 3T3-L1 en las que se indica, se trataron con AY 9944 durante las 24 h previas a la diferenciación. La diferenciación se indujo durante 10 min con los tratamientos indicados para el análisis de la vía de ERK1/2 y p38 o durante 30 minutos para el análisis de la vía de PKB/Akt. En los tres casos se analizaron mediante western-blot los niveles de proteína fosforilada y proteína total en 50 μ g de extractos de proteína total. Anis, anisomicina. Se muestran western-blots representativos de al menos 3 experimentos independientes.

2. Aislamiento de distintas fracciones de membrana e identificación de fracciones correspondientes a “lipid rafts”

Para poder emprender un estudio detallado del efecto provocado por la disminución en el contenido de colesterol celular sobre la estructura y funcionalidad de los “lipid rafts” en preadipocitos 3T3-L1, lo primero fue desarrollar un método que permitiera el aislamiento e identificación de tales regiones de membrana. Con este objetivo, las células 3T3-L1 se sometieron al fraccionamiento de membrana descrito en el apartado 12 de Material y Métodos y se analizaron, mediante western-blot, los niveles de caveolina-1 (proteína característica de estos dominios), y receptor de transferrina (RTf) (proteína característica de otras regiones de membrana), para identificar las fracciones correspondientes a los “lipid rafts”; y a las fracciones de membrana no-“raft”, respectivamente (Fig 25A). Los resultados nos permitieron identificar las zonas de “lipid rafts” como las fracciones 2 y 3 (fracciones donde se detectan mayores niveles de caveolina-1) y las zonas correspondientes a membrana no-“raft” como las fracciones de la 8 a la 12 (fracciones donde se detecta el RTf) de nuestro gradiente de densidad (Fig 25A).

Por otro lado, los “lipid rafts” se definen como microdominios de membrana de baja densidad ricos en colesterol y triglicéridos y con un bajo contenido en proteínas si se les compara con otras regiones de membrana (Pike, 2003). Es por ello por lo que quisimos confirmar que en las fracciones del gradiente consideradas “lipid rafts” existían, en efecto, elevados niveles de colesterol y bajos niveles de proteínas. Así, incubamos células 3T3-L1 en LPDS, fraccionamos sus membranas y analizamos el contenido de colesterol mediante HPLC y el contenido de proteínas mediante BCA en las distintas fracciones. Según lo esperado, en las fracciones de membrana 2 y 3 se detectaron elevados niveles de colesterol y bajos niveles en el contenido de proteínas, mientras que en las fracciones no-“raft” los resultados van en sentido contrario (Fig 25B).

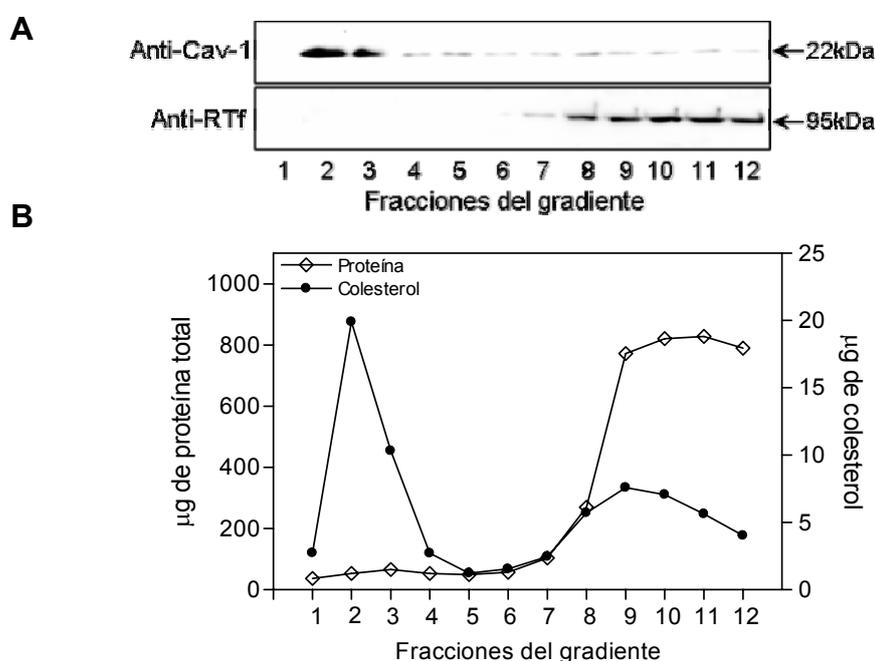


Fig 25. Identificación de las fracciones del gradiente correspondientes a “lipid rafts”. A. Western-blot de caveolina-1 (Cav-1) (proteína específica de “lipid rafts”) y de receptor de transferrina (RTf) (proteína específica de regiones de membrana no-“raft”) en las distintas fracciones del gradiente de células 3T3-L1 incubadas en LPDS. B. Determinación del contenido de colesterol y proteínas (expresados en μg) en las distintas fracciones del gradiente de células 3T3-L1 incubadas en LPDS. Las imágenes de western-blot son representativas de al menos tres experimentos independientes.

3. Efecto de la inhibición de la síntesis de colesterol sobre la estructura de los “lipid rafts”

A continuación nos interesó analizar la composición en esteroides de los “lipid rafts” en situaciones de inhibición de la colesterogénesis y la localización de componentes específicos de estos microdominios.

3.1. Efecto del SKF 104976 sobre la incorporación de esteroides de nueva síntesis a las distintas regiones de membrana

Los inhibidores de la síntesis de colesterol provocan, como hemos visto anteriormente, una acumulación de distintos intermediarios según el punto de la ruta en que bloqueen la colesterogénesis (Fig 12A y B). Para observar el efecto de la inhibición de la colesterogénesis sobre la composición lipídica de los “lipid rafts” quisimos comprobar, en primer lugar, la capacidad de los intermediarios de incorporarse a la membrana plasmática y afectar su composición. Para ello, utilizamos el inhibidor más proximal de la ruta de síntesis de colesterol a partir de lanosterol, el SKF 104976. Tal inhibidor provoca la acumulación de los primeros esteroides que se sintetizan en la ruta de síntesis, y por tanto, más alejados al colesterol estructuralmente hablando. Supusimos que si estas especies eran capaces de incorporarse a la membrana, otros intermediarios con estructura más cercana a la del colesterol serían más eficientes a la hora de hacerlo. Incubamos células 3T3-L1 durante 10 h en LPDS solo (células control) o con SKF 104976 3 μ M solo o en compañía de colesterol 30 μ g/ml. Después de 2 h de preincubación en estas condiciones, se añadió [14 C]-acetato al medio y se prolongó la incubación durante 8 h más. Una vez transcurrido este tiempo, se separaron las distintas fracciones de membrana mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad y se analizó mediante HPLC la radioactividad correspondiente a los esteroides de nueva síntesis presente en las distintas fracciones de membrana. En las células control, el 50% del colesterol sintetizado se detectó en la membrana, localizándose preferentemente en las fracciones correspondientes a los “lipid rafts” y, en menor medida (5 veces menos), también en las fracciones de membrana no-“raft” (Fig 26). El tratamiento con SKF 104976 bloqueó la síntesis de colesterol y, consiguientemente, apenas apareció colesterol radiactivo en las membranas (Fig 26). En estas condiciones, sin embargo, tanto el lanosterol como el dihidrolanosterol se detectaron en los “lipid raft” y en los no-“raft” (Fig 26). La adición de colesterol al medio de incubación de las células conjuntamente con SKF 104976 produjo un descenso de la incorporación de lanosterol y dihidrolanosterol radioactivos en ambas regiones de membrana (Fig 26). Estos resultados demuestran que los esteroides intermediarios de la biosíntesis de colesterol son capaces de incorporarse y formar parte tanto de los “lipid raft” como de los dominios no-“raft”.

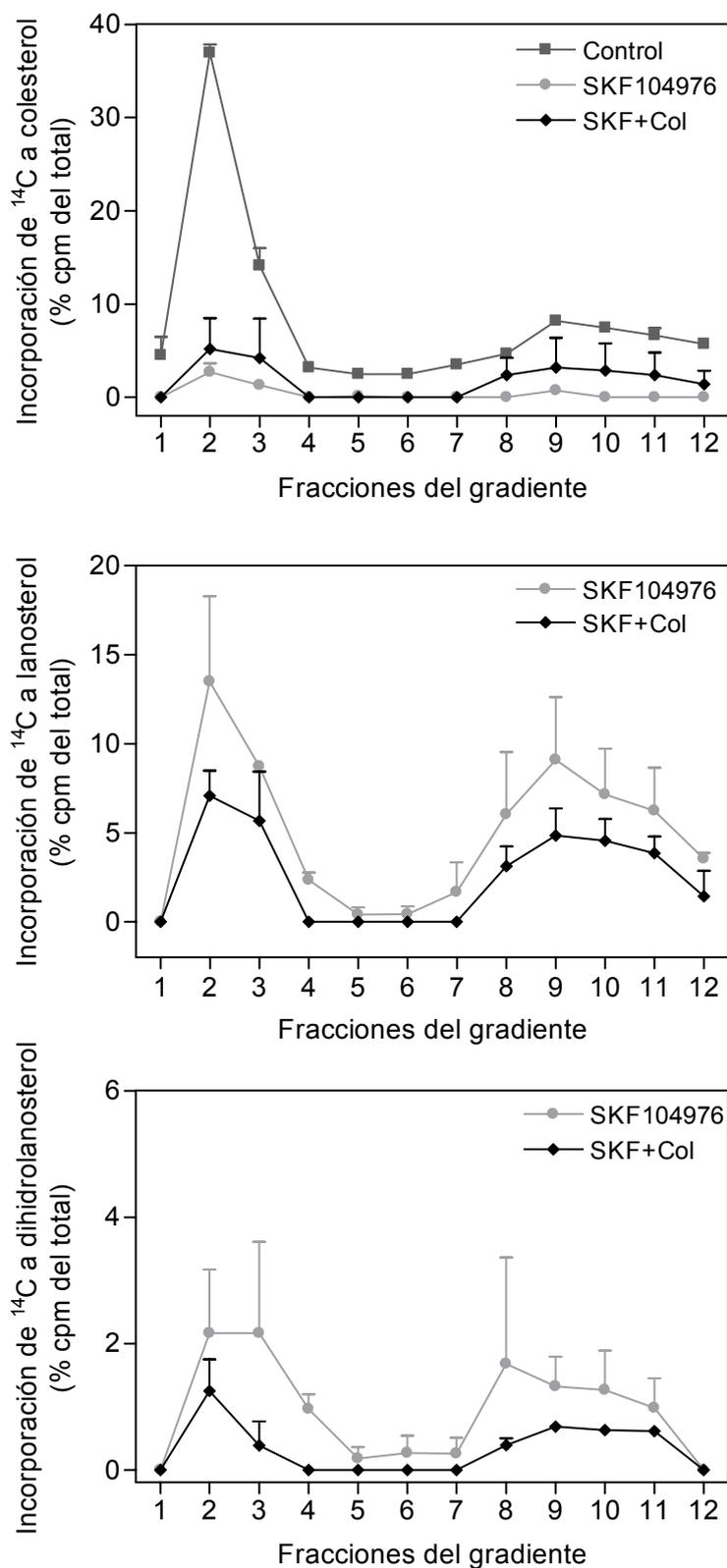


Fig 26. Efecto del SKF 104976 sobre la incorporación de los esteroides de nueva síntesis a las distintas fracciones de membrana en células 3T3-L1. Las células 3T3-L1 se incubaron durante 24 h en LPDS solo (control) o con SKF 104976 3 μ M solo o en combinación con colesterol 30 μ g/ml, se aislaron las distintas fracciones de membrana y se analizó mediante HPLC la incorporación de colesterol de nueva síntesis, así como de los dos intermediarios acumulados (lanosterol y dihidrolanosterol) por efecto del SKF 104976, en cada una de ellas. Los datos de cada fracción se expresan como % de las cpm (cuentas por minuto) de todas las fracciones de membrana (media \pm DE; n=3).

3.2. Efecto de distintos inhibidores de la colesterogénesis en la composición en esteroides de las distintas fracciones de membrana en células 3T3-L1

Las células 3T3-L1 se incubaron durante 24 h en LPDS solo (células control), con colesterol 30 µg/ml y con distintos inhibidores de la colesterogénesis (SKF 104976 3 µM, AY 9944 5 µM, 5,22-colestadien-3β-ol 1 µg/ml o triparanol 3 µM) en ausencia o en presencia de colesterol 30 µg/ml. Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento, se aislaron las distintas fracciones de membrana por ultracentrifugación en gradiente de densidad. Posteriormente se determinó su contenido en proteínas y se analizó mediante HPLC el contenido de los distintos esteroides en las fracciones recogidas. Por motivos exclusivamente descriptivos, los resultados de los diferentes experimentos se resumen en la Tabla 5 de la siguiente manera: los datos de las fracciones 2 y 3 que representan a los “lipid rafts” y por otro lado, los datos de las fracciones 8, 9 y 10, representativos de las regiones de membrana no-“raft”. Los datos se expresan en µg de esteroide por mg de proteína. En células control el contenido de colesterol en los “lipid rafts” fue aproximadamente 12 veces mayor que el de fracciones correspondientes a no-“raft” (Tabla 5), siendo el porcentaje de colesterol presente en las fracciones 2 y 3, el $40,7 \pm 7,7\%$, y el presente en las fracciones de la 8 a la 10, el $29,7 \pm 6,6\%$ del total de colesterol contenido en todas las fracciones de membrana. La incubación de las células con colesterol libre produjo un aumento en el contenido de colesterol en ambas regiones de membrana de manera proporcional (Tabla 5). El tratamiento con los distintos inhibidores provocó una disminución en el contenido de colesterol tanto en regiones de “lipid raft” como no-“raft” acompañado de una acumulación de distintos intermediarios de la ruta de colesterogénesis (Tabla 5). Así, las células tratadas con SKF 104976 acumularon lanosterol y dihidrolanosterol (Tabla 5), las tratadas con AY 9944, acumularon 7-DHC y 7-DHD, las incubadas en presencia de 5,22-colestadien-3β-ol acumularon 7-DHD y desmosterol y, por último, las células tratadas con triparanol 3 µM acumularon 7-DHD y zimosterol. Los intermediarios se detectaron tanto en “lipid rafts” como en regiones de membrana no-“raft” (Tabla 5). Por otra parte, en células tratadas con SKF 104976 o AY 9944, la presencia de colesterol evitó la disminución en el contenido de colesterol en las regiones de membrana pero sólo en parte, la incorporación de los intermediarios (Tabla 5).

Una vez analizados los efectos en la composición lipídica de los “lipid rafts” por efecto de la inhibición de la síntesis de colesterol nos propusimos abordar las consecuencias que tendría el tratamiento de las células 3T3-L1 con distintos inhibidores de la colesterogénesis sobre la localización de algunos de los componentes específicos de los “lipid rafts” como la caveolina-1 y el gangliósido GM1.

Tabla 5. Efecto de distintos inhibidores de la colesterogénesis en la composición de distintas regiones de membrana en células 3T3L1. Las células 3T3-L1 se incubaron durante 24 horas en LPDS solo (control), con colesterol 30 µg/ml, o con distintos inhibidores (SKF 104976 3 µM, AY 9944 5 µM, 5,22-colestadien-3β-ol 1 µg/ml y triparanol 3 µM) solos o con colesterol. Transcurrido el tiempo de tratamiento se aislaron las distintas fracciones de membrana, y se analizó por HPLC la composición en esteroides de las fracciones correspondientes a “lipid rafts” (fracciones 2 y 3) y a regiones de membrana no-“raft” (fracciones 8, 9 y 10). Los datos se expresan como µg de esteroide por mg de proteína (media ± DE; n=3). Las comparaciones estadísticas se realizaron frente a las células control (* $p < 0,05$) o frente al tratamiento con el AY9944 († $p < 0,05$). (7-DHC) 7-deshidrocolesterol, (7-DHD) 7-deshidrodeshmosterol, (—) no detectable.

	Colesterol		Lanosterol		Dihidrolanosterol		7DHC		7DHD		Desmosterol		Zimosterol	
	Raft	No-raft	Raft	No-raft	Raft	No-raft	Raft	No-raft	Raft	No-raft	Raft	No-raft	Raft	No-raft
Control	508±118	42.9±4.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Colesterol	699±222	73.1±8.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SKF 104976	302±46*	27.0±5.7	27.9±0.3	3.9±0.5	158±17.3	9.5±1.4	-	-	-	-	-	-	-	-
SKF 104976 + Colesterol	529±146	58.3±30,	17.5±6.6	3.2±1.1	51.2±1.7	12.4±6.2	-	-	-	-	-	-	-	-
AY 9944	333±78*	28.2±8.9	-	-	-	-	68.2±1	2.5±2.1	24.6±1.2	2.7±1.8	-	-	-	-
AY 9944 + Colesterol	617±190†	39.8±17	-	-	-	-	42.0±2.8	1.6±1.4	11.0±1.1	-	-	-	-	-
5,22-colestadien- 3β-ol	257±34*	17.3±5.4	-	-	-	-	-	-	79.2±18.8	7.7±6.2	26±3.5	2.0±1.0	-	-
Triparanol	180±19*	12.6±2.1	-	-	-	-	-	-	30.3±2.5	2.9±1.1	-	-	41.0±4.0	3.5±1.4

3.3. Efecto de la inhibición de la colesterogénesis sobre la presencia en “lipid rafts” de distintos componentes específicos de estos microdominios

La distribución de componentes de “lipid rafts” como la caveolina-1 y el gangliósido GM1 es un valioso indicador de la estructura de estos microdominios de membrana. Para analizar el efecto de la inhibición de la colesterogénesis sobre ello, incubamos las células 3T3-L1 en medio con LPDS al 10% en ausencia (control) y presencia de distintos inhibidores de la colesterogénesis (SKF 104976 3 μM , AY 9944 5 μM , 5,22-colestadien-3 β -ol 1 $\mu\text{g/ml}$ o triparanol 3 μM) durante 20 h y realizamos dos comarques (Fig 27). En el primero (Fig 27A), incubamos las células con la subunidad B de la toxina colérica conjugada con FITC (CtxB-FITC) para detectar el gangliósido GM1 y posteriormente las teñimos con filipina (utilizada para marcar colesterol) según lo descrito en el apartado 20.2 de Material y Métodos. En el segundo comarques, las células se incubaron también con la CtxB-FITC y a continuación se realizó inmunocitoquímica para detectar caveolina-1 (Fig 27B).

El estudio de la colocalización de GM1 y colesterol confirma que el GM1 se ubica en regiones de la membrana ricas en colesterol, como indicó la aparición de zonas de colocalización que se muestran de color amarillo al solapar ambos marcajes (Merge) en células control (Fig 27A). Estas zonas de colocalización corresponden a las regiones de “lipid rafts”. Sin embargo, el tratamiento con los inhibidores provocó una disminución en la intensidad de los marcajes de filipina y GM1, así como una pérdida de colocalización entre ambos (Fig 27A).

En cuanto a la colocalización de GM1 y caveolina-1, los resultados obtenidos fueron similares a los anteriores (Fig 27B). En este caso las imágenes se captaron mediante microscopía confocal. En las células control se observaron zonas de colocalización de GM1 y caveolina-1 (Fig 27B), pero al tratar las células con cualquiera de los inhibidores, encontramos una disminución en la intensidad de ambos marcajes, así como una pérdida total de colocalización entre GM1 y caveolina-1 (Fig 27B). En conjunto, estos resultados señalan que la inhibición de la colesterogénesis provoca una deslocalización de dos componentes de membrana típicamente localizados en “lipid rafts”, el GM1 y la caveolina-1, apoyando la idea de que un descenso en los niveles de colesterol en “lipid rafts” conduce a una desestructuración de estos dominios.

3.4. Efecto de la inhibición de la síntesis de colesterol sobre la distribución de caveolina-1 en las distintas fracciones de membrana

Teniendo en cuenta los resultados anteriores en los que la reducción en los niveles de colesterol provoca una deslocalización de componentes específicos de “lipid rafts”, nos propusimos ahondar más en el efecto de la inhibición de la colesterogénesis a este respecto. Para ello elegimos una proteína específica de “lipid rafts”, la caveolina-1, presente en estos microdominios en células 3T3-L1 (Huo et al., 2003). Nos planteamos detectar la localización de esta proteína en las distintas fracciones de membrana en estas células tratadas con distintos inhibidores de la síntesis de colesterol. Así, durante 24 h incubamos células 3T3-L1 en medio con LPDS al 10% solo (células control) o suplementado con colesterol 30 $\mu\text{g/ml}$ o con distintos inhibidores (SKF 104976 3 μM , AY 9944 5 μM , 5,22-colestadien-3 β -ol 1 $\mu\text{g/ml}$ o triparanol 3 μM) solos o en compañía de colesterol. En todos los casos, el tratamiento con los inhibidores provocó una disminución en el contenido de caveolina-1 en las fracciones de “lipid rafts” respecto a células control y un aumento en las fracciones de membrana no-“raft” (Fig 28). Este efecto de los inhibidores fue evitado, en parte, al incubar las células conjuntamente con colesterol (Fig 28).

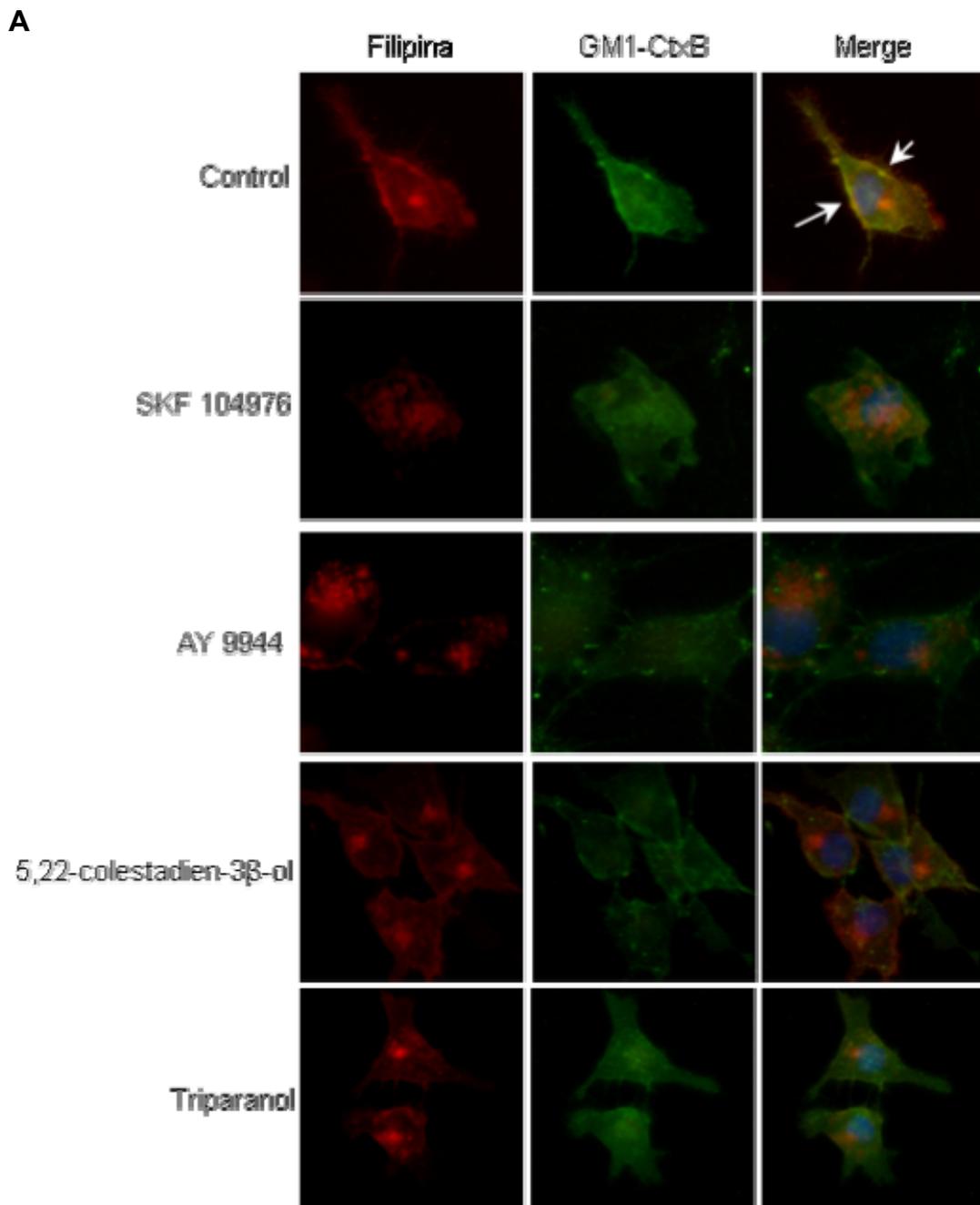


Fig 27A. Efecto de distintos inhibidores de la colesterogénesis sobre componentes de “lipid rafts”. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células 3T3-L1 incubadas en LPDS solo (control) o con distintos inhibidores de la colesterogénesis (SKF 104976 3 μ M, AY 9844 5 μ M, 5,22-colestadien-3 β -ol 1 μ g/ml o triparanol 3 μ M) donde se observa marcaje de colesterol (filipina) y de GM1 (GM1-CtxB), así como las zonas de colocalización al solapar ambos marcajes (Merge), indicados por las flechas blancas.

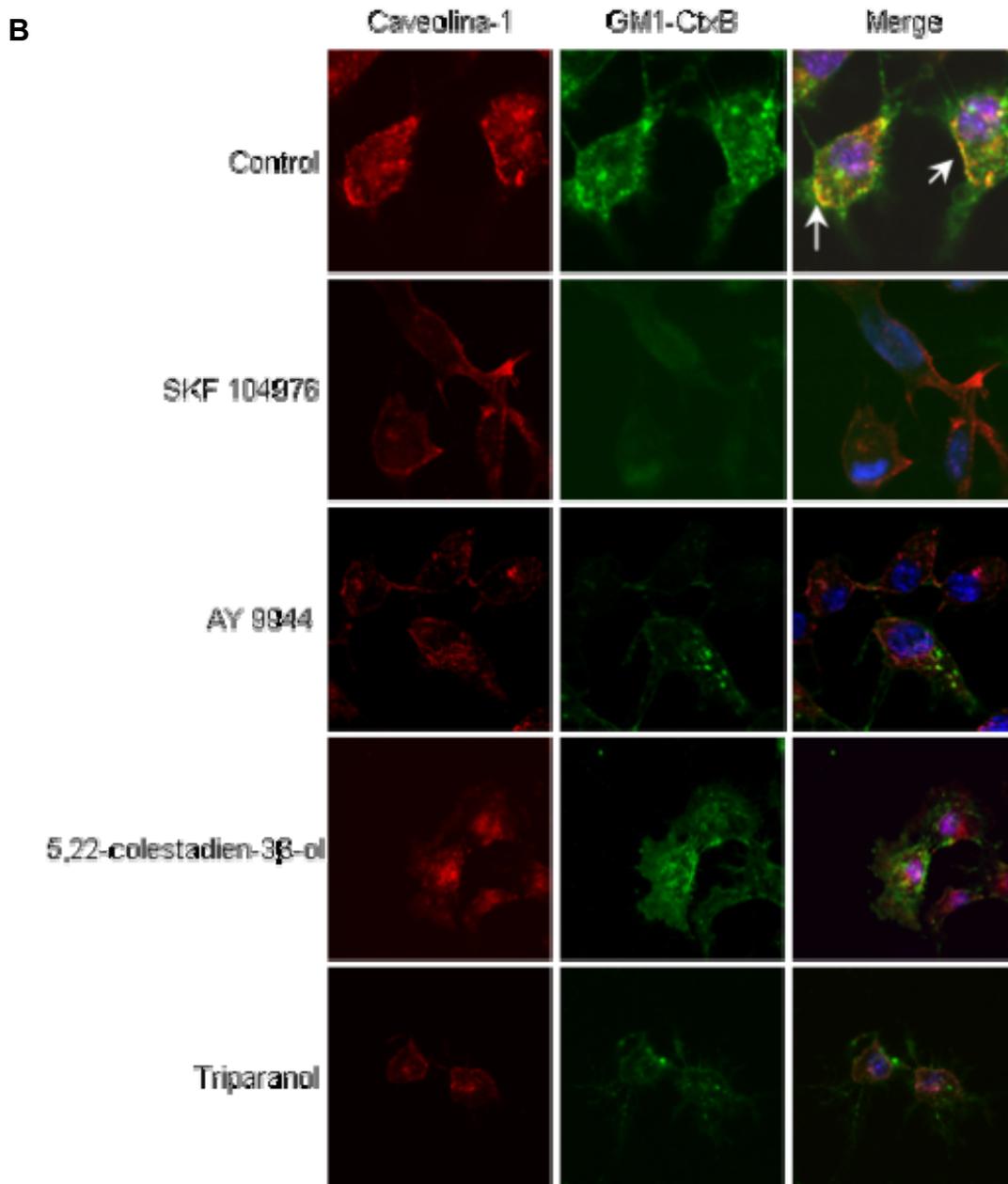


Fig 27B. Efecto de distintos inhibidores de la colesterogénesis sobre componentes de “lipid rafts”. Imágenes de microscopía confocal de células 3T3-L1 tratadas como en el caso anterior en las que se detecta la presencia de caveolina-1 y GM1 así como las zonas de colocalización de ambos en las imágenes de Merge. En todos los casos, las células que se muestran son representativas de la preparación en todos los casos. Todas las fotografías se tomaron a 60 aumentos. El color del marcaje con filipina ha sido manipulado para una mejor percepción de los resultados. Las flechas blancas indican las zonas de colocalización de ambos marcajes.

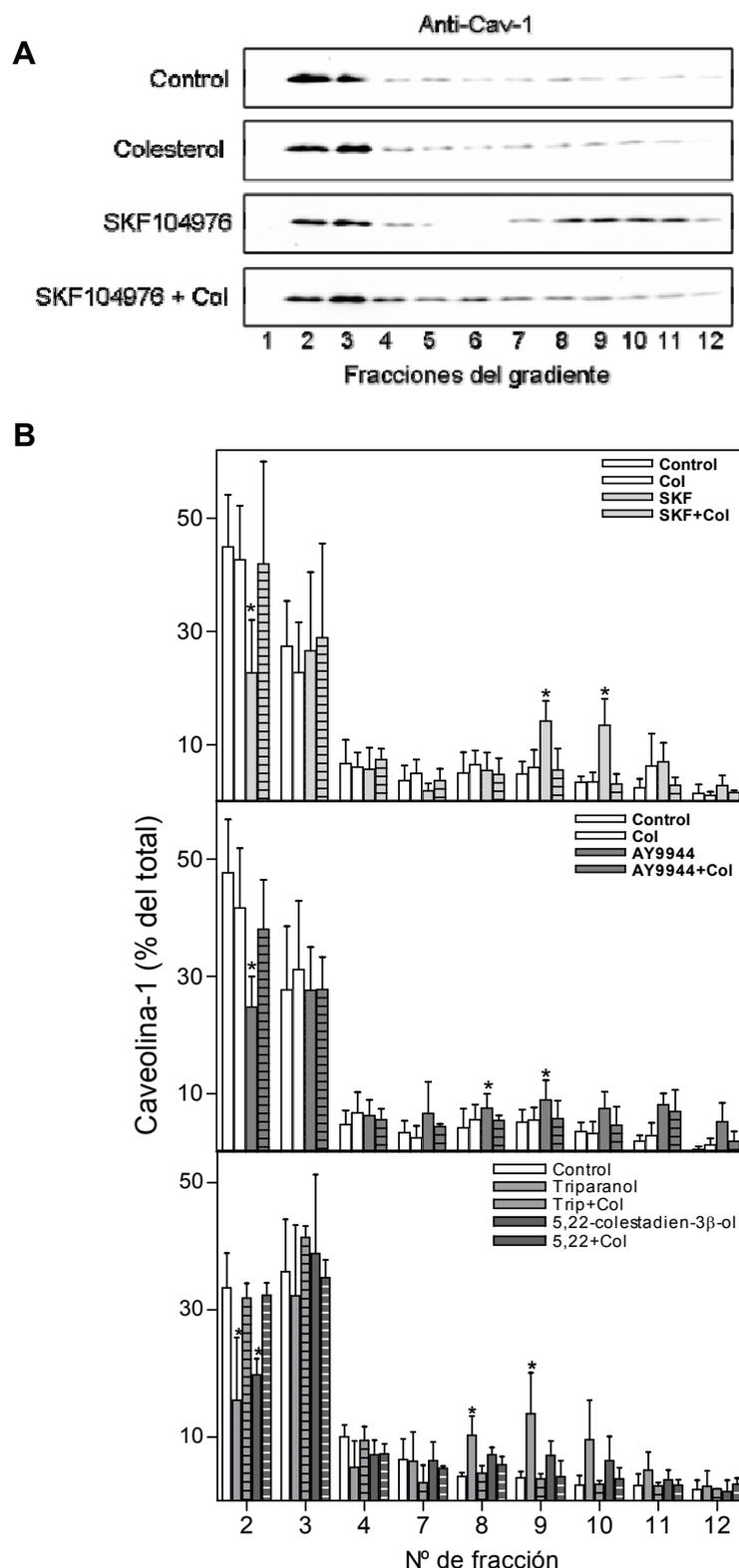


Fig 28. Efecto de la inhibición de la colesterogénesis sobre la distribución de la caveolina-1 en las distintas fracciones de membrana en células 3T3-L1. A. Western-blot de caveolina-1 en las distintas fracciones de membrana de células 3T3-L1 incubadas en LPDS solo (control), con colesterol 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$, SKF 104976 3 μM o SKF 104976 con colesterol. Los western-blots son representativos de al menos tres experimentos independientes. B. Gráficas en las que se representa la cuantificación mediante desintometría de los niveles de caveolina-1 en cada una de las fracciones del gradiente. Los datos se expresan como % de caveolina-1 en cada fracción respecto a la suma del contenido de caveolina-1 en todas las fracciones (media \pm DE; n=3). La comparación estadística se realizó frente a las células contol (* $p < 0,05$).

4. Efectos de la inhibición de la colesterogénesis sobre la funcionalidad de la señalización por insulina en células 3T3-L1

Una vez conocida la alteración de la estructura de los “lipid rafts”, derivada de cambios en su composición lipídica y proteica, quisimos avanzar en nuestro estudio analizando el efecto de la disminución del contenido de colesterol en los “lipid rafts” sobre la funcionalidad del receptor de insulina (RI) y la señalización que éste media. En primer lugar, debimos confirmar la localización del RI en estos microdominios de membrana y a continuación, estudiar alteraciones en el contenido y actividad del mismo, así como de otras proteínas implicadas en la transducción de señales a partir de dicho receptor.

4.1. Localización del RI y otras proteínas de la ruta en los “lipid rafts” de células 3T3-L1

Para poder establecer la presencia del RI y Fyn (proteína acopladora implicada en la transducción de señales mediada por el RI) en los “lipid rafts” incubamos células 3T3-L1 en LPDS al 10% durante 24 h y fraccionamos las membranas plasmáticas en un gradiente de densidad de sacarosa. Medimos la concentración de proteínas en todas las fracciones, precipitamos mediante TCA al 10% cantidades iguales de proteína de dichas fracciones y analizamos, mediante western-blot, los niveles de la subunidad β del RI (RI β) y de Fyn (Fig 29). Tanto la subunidad β del RI como Fyn se detectaron casi exclusivamente en las fracciones 2 y 3 del gradiente, correspondientes a los “lipid rafts” (Fig 29).

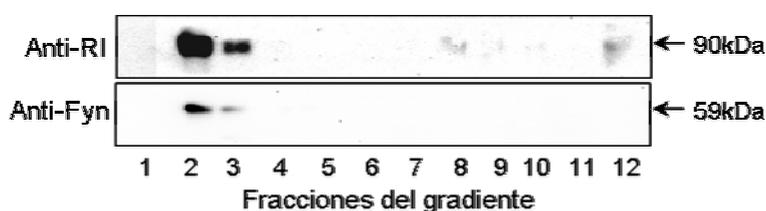


Figura 29. Localización del RI y Fyn en los “lipid rafts” de células 3T3-L1. Western-blot de RI β y Fyn en las fracciones de membrana del gradiente de células 3T3-L1 mantenidas en LPDS. Los western-blot que se muestran son representativos de al menos tres experimentos independientes.

4.2. Efecto de la inhibición de la colesterogénesis sobre la activación del RI y la localización de la proteína acopladora Fyn en los “lipid rafts”

Otros autores han demostrado que la disminución del contenido de colesterol en las membranas de preadipocitos 3T3-L1 bloquea la adipogénesis de estas células, desestructura los microdominios de membrana y afecta a la señalización por insulina (Hong et al., 2004; Huo et al., 2003). Estas observaciones junto con las nuestras que demuestran que la inhibición de la colesterogénesis bloquea la adipogénesis en células 3T3-L1 y altera la estructura de los “lipid rafts” nos impulsó a comenzar el estudio de la funcionalidad de la señalización del RI. Por otra parte, como se acaba de mostrar, la subunidad β del RI, así como la proteína acopladora Fyn, se encuentran localizadas en los microdominios “lipid rafts” (Fig 29). Para determinar el efecto de la disminución del contenido de colesterol sobre la actividad del RI, incubamos los

preadipocitos 3T3-L1 en medio con LPDS al 10% solo (células control) o en presencia de distintos inhibidores de la colesterogénesis (SKF 104976 3 μ M, AY 9944 5 μ M o triparanol 3 μ M) solos o en combinación con colesterol 30 μ g/ml durante 24 h y posteriormente, estimulamos el RI y su cascada de señalización con insulina 20 nM durante 10 minutos. Inmediatamente después, las células se lavaron y se procesaron para el aislamiento de las distintas fracciones de membrana. Células 3T3-L1 mantenidas en LPDS sin estimulación con insulina durante el tiempo de tratamiento fueron procesadas de la misma manera para utilizarlas como control negativo de la estimulación por insulina. El control positivo de esta estimulación son células 3T3-L1 tratadas con insulina en presencia de LPDS al 10%. Una vez aisladas las fracciones de membrana, analizamos los niveles de fosforilación en tirosina de la subunidad β del RI (p-Tyr), así como sus niveles de proteína total y la expresión de Fyn en las fracciones de menor densidad del gradiente (fracciones 2, 3 y 4), y en las fracciones de membrana no-“raft” (fracciones 8, 9 y 10). Como se observa en la Figura 30, la estimulación de las células con insulina aumentó los niveles de p-Tyr del RI, mientras que el tratamiento con los inhibidores produjo un descenso significativo de estos niveles y, en consecuencia, un descenso en su actividad en las fracciones 2 y 3 del gradiente (“lipid rafts”). De la misma manera, los niveles de Fyn en dichas fracciones también disminuyeron al inhibir la síntesis de colesterol (Fig 30). El tratamiento conjunto con colesterol evitó el efecto de los inhibidores sobre la actividad del RI y la deslocalización de Fyn en los “lipid rafts” (Fig 30). A pesar de que la insulina produjo un aumento significativo en los niveles de RI β total en estos microdominios, no se observaron cambios significativos en el contenido de RI β total entre los distintos tratamientos en células estimuladas con insulina (Fig 30).

4.3. Efecto de la inhibición de la colesterogénesis sobre la activación de la vía de PKB/Akt

Una de las vías de señalización más implicadas en la transducción de señales al núcleo a partir de la insulina y su receptor es la vía de la PKB/Akt (Datta et al., 1999). Una vez conocida la alteración en la actividad del RI por disminución del contenido de colesterol (Fig 30) quisimos confirmar alteraciones en la vía de Akt. Con este objetivo, incubamos células 3T3-L1 durante 24 h en LPDS al 10% solo (células control) o en presencia de distintos inhibidores de la colesterogénesis (SKF 104976 3 μ M, AY 9944 5 μ M o triparanol 3 μ M) solos o en compañía de colesterol 30 μ g/ml, estimuladas o no con insulina 1 μ M. A continuación analizamos, mediante western-blot los niveles de Akt fosforilada en serina 473 (p-Akt) y de proteína total en lisados celulares totales. Como se observa en la figura 31, la estimulación con insulina en las células 3T3-L1 se acompañó de un incremento de la fosforilación de Akt. Por otra parte, la inhibición de la síntesis de colesterol con distintos inhibidores redujo la capacidad de la insulina para activar la vía de Akt (Fig 31). Por último, el tratamiento conjunto con colesterol evitó los efectos de los inhibidores de la biosíntesis de colesterol. Debe también señalarse que no se observaron cambios en la cantidad de Akt total entre ninguno de los tratamientos (Fig 31).

De todos estos experimentos podemos afirmar que la inhibición de la síntesis de colesterol altera la señalización mediada por insulina en preadipocitos 3T3-L1.

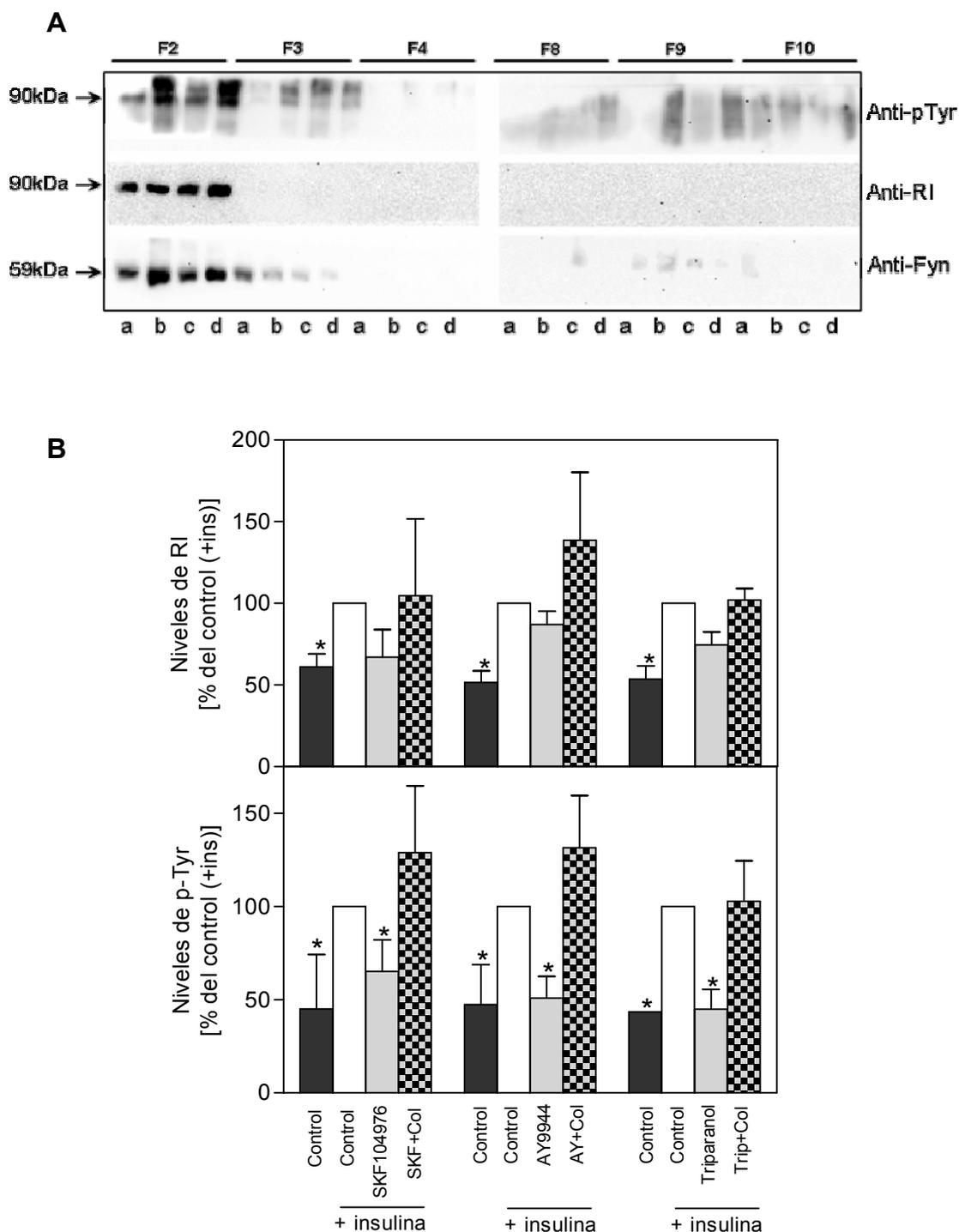


Figura 30. Efecto de la inhibición de la síntesis de colesterol sobre la activación del RI y la localización de Fyn en “lipid rafts”. A. Western-blot donde se detectan los niveles de p-Tyr en el RI, así como sus niveles de proteína total y la cantidad de Fyn en fracciones de “lipid raft” y no-“raft” de células 3T3-L1. **a**, células 3T3-L1 mantenidas en LPDS (control negativo de la estimulación con insulina); **b**, células 3T3-L1 en LPDS estimuladas con insulina (control+ins, control positivo de la estimulación con insulina); **c**, células 3T3-L1 tratadas con SKF 104976 3 μ M y estimuladas con insulina y **d**, células 3T3-L1 tratadas con SKF 104976 y colesterol 30 μ g/ml y estimuladas con insulina. Los western-blots mostrados son representativos de al menos tres experimentos independientes. B. Cuantificación densitométrica de los niveles de p-Tyr, así como la forma total de RI β de western-blots realizados con los distintos inhibidores y tratamientos que se indican. Los datos se expresan como % del control de estimulación (media \pm DE, n=3-4). Las comparaciones estadísticas se realizaron frente al control + insulina (* p <0,05). AY, AY 9944 5 μ M; Trip, triparanol 3 μ M; Col, colesterol 30 μ g/ml.

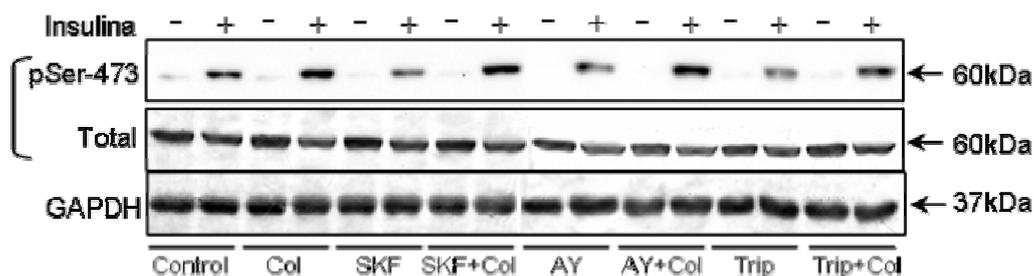


Fig 31. Efecto de la inhibición de la colesterogénesis sobre la actividad de la vía de Akt. Western-blot de p-Akt y Akt total en células 3T3-L1 tratadas durante 24 h en LPDS solo (control) y con distintos inhibidores (SKF 104976 3 μ M (SKF), AY 9944 5 μ M (AY) o triparanol 3 μ M (Trip) solos o con colesterol 30 μ g/ml (Col) y estimuladas (+) o no (-) con insulina 1 μ M durante 20 minutos. Se utilizó GAPDH como control de carga. Los western-blots que se muestran son representativos de al menos tres experimentos independientes.

4.4. Efecto de la inhibición de la colesterogénesis sobre la captación de glucosa en células 3T3-L1

Nos pareció interesante comprobar si alteraciones en la funcionalidad la vía de señalización del RI se traducían en cambios fisiológicos a nivel celular afectando la función principal de la insulina, que es la estimulación de la captación de glucosa desde el medio (Sharma et al., 2008). Para ello, incubamos preadipocitos 3T3-L1 durante 24 h en medio con LPDS al 10% solo (células control), con distintos inhibidores de la colesterogénesis (SKF 104976 3 μ M, AY 9944 5 μ M o triparanol 3 μ M) solos o en compañía de colesterol 30 μ g/ml o con β MCD (10 mM) durante 50 min. Estas últimas células se mantuvieron en LPDS al 10% y los últimos 50 min de incubación se trataron con 10 mM de β MCD. Posteriormente, se realizó un ensayo de captación de glucosa según se ha descrito en el apartado 21 de Material y Métodos y se midió, mediante contaje radioactivo, la cantidad de glucosa que las células incorporaron en cada caso. El control negativo del ensayo, que indica la captación basal de glucosa, fueron células 3T3-L1 mantenidas en LPDS donde se realizó el ensayo en ausencia de estimulación con insulina. Los resultados fueron que la capacidad de las células para adquirir glucosa del medio disminuyó por efecto de todos los inhibidores utilizados (Fig 32) y, además, la adición de colesterol al medio evitó tales efectos. Por último, la extracción masiva del colesterol de la membrana celular por acción de la β MCD también provocó una disminución en la captación de glucosa por parte de estas células, que fue más acusada que en el caso del tratamiento con los inhibidores (Fig 32).

4.5. Localización de la proteína acopladora Fyn en los mismos microdominios que el RI

Como acabamos de mostrar, tanto la subunidad β del RI como la proteína acopladora Fyn se localizan en "lipid rafts" de células 3T3-L1, pero quisimos comprobar que existía una interacción directa entre ellas, facilitada por la presencia de ambas proteínas en los mismos microdominios de membrana. Para ello, cantidades iguales de proteína de las fracciones 2 y 3 de un gradiente de densidad de células 3T3-L1 estimuladas con insulina 20 nM durante 10 min, se concentraron utilizando el sistema de centrifugación en filtros Centricon. A continuación, en este concentrado se inmunoprecipitó el RI β y se analizaron mediante western-blot los niveles de RI β total y fosforilado en tirosina, así como los niveles de Fyn y de caveolina-1. Quisimos detectar estos niveles tanto en la fracción de "lipid rafts" que precipita con el RI β (2), como en el

sobrenadante de la inmunoprecipitación (1), que se corresponde con los “lipid rafts” que no contienen RI. En la figura 33, observamos que el RI activado (fosforilado en tirosina) inmunoprecipita junto con Fyn y caveolina-1. Sin embargo, no toda la caveolina-1 presente en los “lipid rafts” se encuentra asociada al RI. Éste sí es el caso de Fyn, que en su mayoría se localiza en las mismas regiones que el RI una vez activado de manera que puede funcionar como su efector (Fig 33).

Estos resultados ponen de manifiesto la interacción entre la activación del RI y la transducción de señales en los mismos “lipid rafts”.

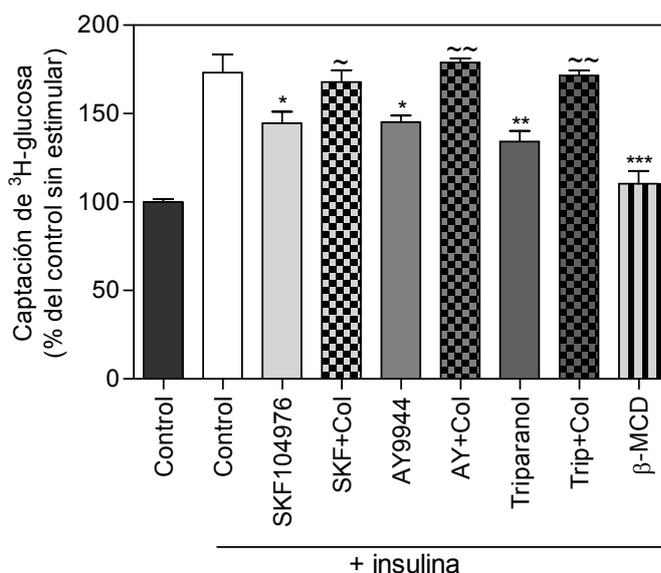


Figura 32. Efecto de la inhibición de la colesterogénesis sobre la captación de glucosa en células 3T3-L1. Las células 3T3-L1 se incubaron en LPDS solo (control), con β-MCD 10 mM durante 50 min o con distintos inhibidores de la colesterogénesis (SKF 104976 3 μM (SKF), AY 9944 5 μM (AY) o triparanol 3 μM (Trip)) solos o con colesterol 30 μg/ml (Col). En cada caso, se determinó la capacidad de las células para captar glucosa del medio. El control negativo del ensayo fueron células 3T3-L1 procesadas como las demás pero en ausencia de estimulación con insulina. Los datos (media ± DE; n=4) se expresan como % del control sin estimular con insulina y la comparación estadística se realizó frente al control (* $p < 0,02$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,002$) y frente a los inhibidores correspondientes (~ $p < 0,05$; ~ ~ $p < 0,01$).

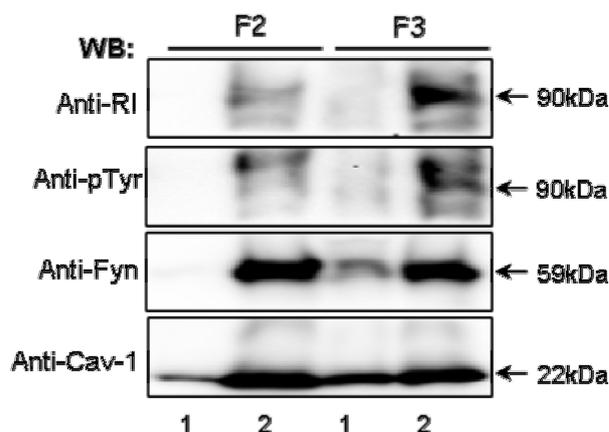


Figura 33. Colocalización de Fyn y RI en los mismos microdominios. Inmunoprecipitación del RIβ y western-blot (WB) de las distintas proteínas que se indican en las fracciones 2 y 3 del gradiente en células 3T3-L1 mantenidas en LPDS. 1. Sobrenadante de la inmunoprecipitación de la fracción de “lipid rafts” con el RIβ. 2. Fracción de “lipid rafts” que inmunoprecipita con el RIβ. F2 y F3, fracciones 2 y 3 de membrana del gradiente de densidad de células 3T3-L1. Los western-blot son representativos de al menos tres experimentos independientes.

De todos estos resultados cabe concluir que la desestructuración de los “lipid rafts” de membrana provocada por la inhibición de la colesterogénesis conduce a un desajuste en la señalización mediada por la insulina que se traduce en la imposibilidad de esta hormona para desencadenar procesos fisiológicos, como es la captación de glucosa. Con ello, proponemos que el bloqueo de la adipogénesis observado anteriormente por inhibición de la síntesis de colesterol está, al menos en parte, provocado por la inhibición de la señalización del estímulo adipogénico que es la insulina. Una alteración en esta señalización afectaría la activación de ERK1/2 impidiendo la fosforilación en Thr188 del C/EBP β y la activación de sus genes diana entre los que se encuentran algunos factores de transcripción implicados en dirigir la adipogénesis.

El haloperidol, es un antipsicótico que actúa como antagonista de los receptores de dopamina. Pero, además, ejerce una serie de efectos a nivel molecular que pueden explicar sus amplios efectos secundarios. Entre estos efectos cabe mencionar la inhibición de la Δ^7 -reductasa (Kelley and Hennekam, 2000; Simpson et al., 1967), la reducción de la fosforilación de Akt en cultivos de células neuronales (Dai et al., 2007; Ukai et al., 2004) y de la captación de glucosa (Dwyer et al., 1999). En "lipid rafts", se localizan tanto receptores tirosina quinasa, como el RI, como GPCRs (Pike, 2003). Se sabe que el haloperidol es capaz de disminuir el número de receptores de somatostatina (un tipo de GPCRs) en el cerebro de animales tratados con este fármaco (Perez-Oso et al., 1989; Perez-Oso et al., 1990). Por tanto, una vez estudiado el efecto de distintos inhibidores de la colesterogénesis sobre la funcionalidad de un receptor tirosina quinasa, el RI, quisimos emprender el estudio del efecto del haloperidol sobre la inhibición de la colesterogénesis, la composición y estructura de los "lipid rafts" y la funcionalidad de la señalización mediada por insulina y somatostatina en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

5. Efecto del haloperidol sobre la síntesis de colesterol en células SH-SY5Y

Elegimos para el estudio una línea celular de neuroblastoma, las células SH-SY5Y, puesto que los efectos más destacados del haloperidol como antipsicótico ocurren a nivel del sistema nervioso central. Lo primero que quisimos analizar fueron los posibles efectos del haloperidol sobre la colesterogénesis. Para ello, incubamos células SH-SY5Y en medio con LPDS al 10% solo (células control) o con distintas dosis de haloperidol: 10 μ M y 50 μ M durante 10 h. A las 2 h de haber comenzado la incubación, tratamos las células con [14 C]-acetato y analizamos mediante HPLC los esteroides sintetizados durante el proceso. En las células control, la radioactividad procedente del acetato se detectó, principalmente, en el pico correspondiente al colesterol (pico 1) y al 7-DHC (pico 2) (Fig 34A). Por su parte, el tratamiento con haloperidol produjo una disminución en la síntesis de colesterol y 7-DHC y, en contraposición, un aumento en la incorporación de la radioactividad al 8,14-colestadien-3 β -ol (pico 3) que fue dosis dependiente (Fig 34A). Según estos resultados, el haloperidol estaría inhibiendo la Δ^{14} -reductasa y posiblemente también la Δ^7 -reductasa en células SH-SY5Y. Cabía la posibilidad de que el pico 1 obtenido de la valoración por HPLC contuviera además de colesterol, zimosterol, porque nuestro método de HPLC no resuelve perfectamente ambos compuestos; por este motivo realizamos un análisis más detallado de los esteroides sintetizados en presencia de haloperidol mediante GC/MS. En este análisis, detectamos la presencia de 7-DHC, zimosterol y 8,14-colestadien-3 β -ol en células tratadas con haloperidol 10 μ M (Fig 34B). A dosis más elevadas de haloperidol, 50 μ M, detectamos niveles más elevados de 8,14-colestadien-3 β -ol, así como menor cantidad de zimosterol y, especialmente, de 7-DHC que en células tratadas con haloperidol 10 μ M (Fig 34). Considerando todos estos resultados, deducimos que el haloperidol inhibe la actividad de las enzimas Δ^7 -reductasa > $\Delta^{8,7}$ -isomerasa > Δ^{14} -reductasa. El tratamiento con haloperidol conduce a la acumulación de distintos esteroides según la dosis utilizada del antipsicótico, alterando, en consecuencia, la composición en esteroides de las células SH-SY5Y.

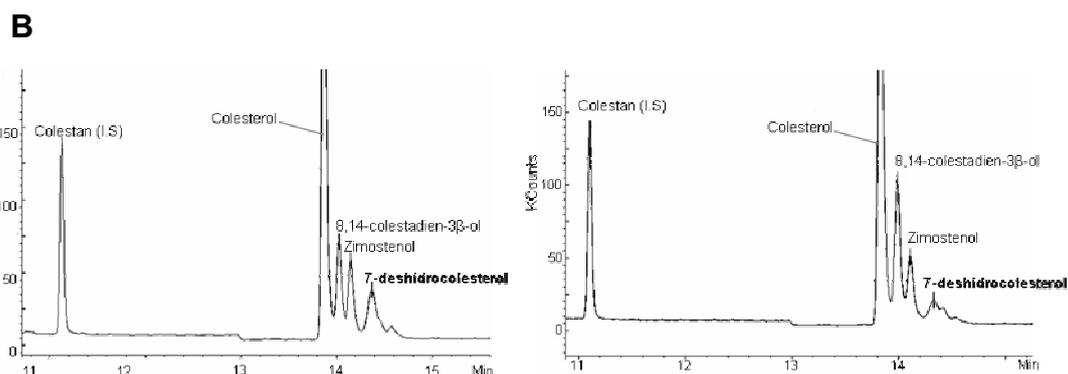
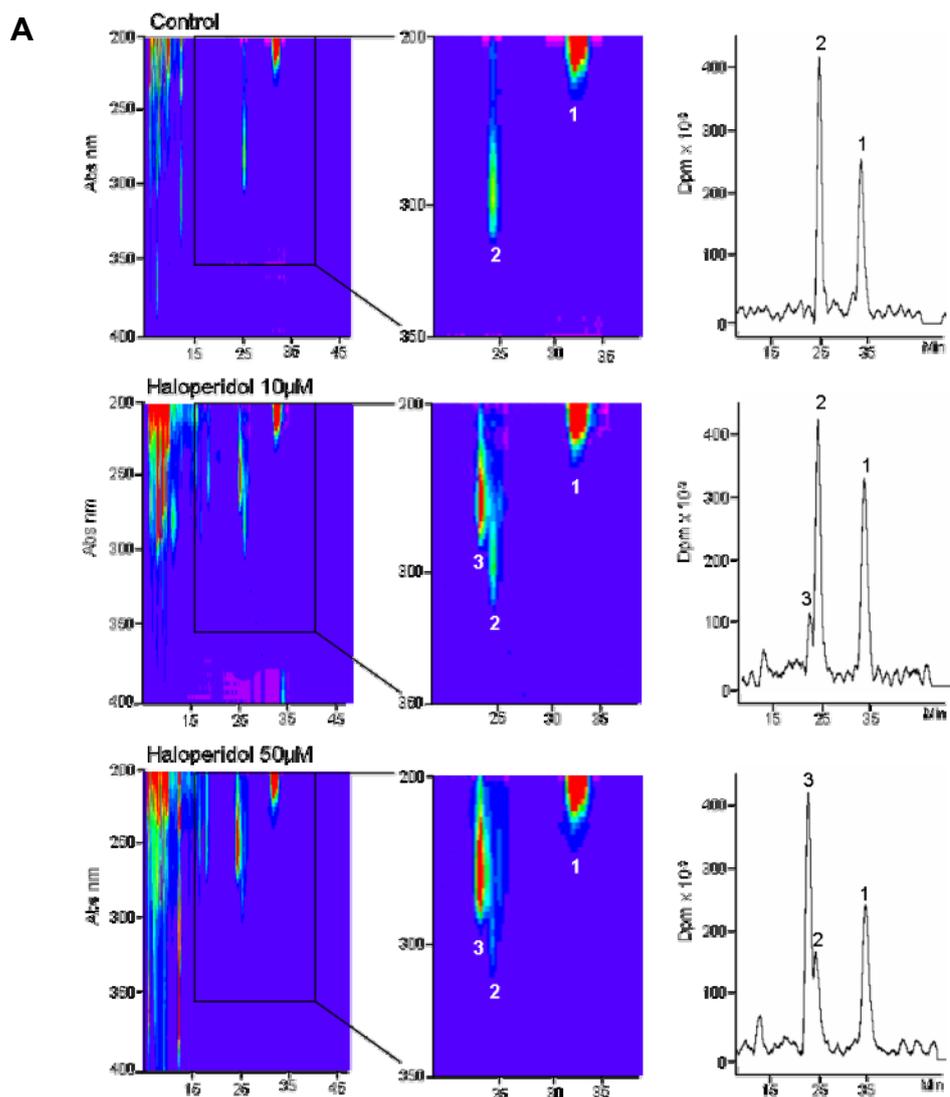


Figura 34. Efecto del haloperidol sobre la colesterogénesis. A. Las células SH-SY5Y se trataron con haloperidol 10 y 50 μM y se analizaron, mediante HPLC los esteroides sintetizados a partir de acetato radioactivo. Se muestran los espectros de absorción y el tiempo de retención de los esteroides presentes en las células en cada tratamiento y los cromatogramas donde se indican los picos correspondientes a cada esteroide, el tiempo de retención y la radioactividad incorporada a cada uno de ellos. Picos identificados: (1) colesterol, (2) 7-DHC y (3) 8,14-colestadien-3 β -ol. B. Las células SH-SY5Y se trataron durante 24 como se indica y se analizaron mediante GC/MS los esteroides presentes en las células. Se muestran cromatogramas de intercambio iónico. I.S. (estándar interno), colestano.

6. Efecto del haloperidol sobre la estructura de los “lipid rafts”

Puesto que otros inhibidores de la colesterogénesis alteran la composición lipídica de las distintas fracciones de membrana y dado que el haloperidol también bloquea dicha ruta de síntesis, emprendimos el estudio de la composición en esteroides de las distintas fracciones de membrana de células SH-SY5Y.

6.1. Efecto del haloperidol sobre la composición en esteroides en las distintas fracciones de membrana de células SH-SY5Y

Una vez conocidos los efectos del haloperidol sobre la colesterogénesis, analizamos el contenido de distintos esteroides en las distintas fracciones de membrana de células de neuroblastoma SH-SY5Y tratadas con haloperidol. Para ello, estas células se incubaron en LPDS al 10% solo (células control), y con haloperidol 10 ó 50 μM en ausencia o en presencia de colesterol libre o en forma de LDL, ambos a la concentración de 30 $\mu\text{g/ml}$. Estas células se procesaron para el aislamiento de las distintas fracciones de membrana y se analizó mediante HPLC su composición en esteroides. Por motivos exclusivamente descriptivos, los resultados de los diferentes experimentos se resumen en la Tabla 6 de la siguiente manera: los datos de las fracciones 2 y 3 que representan a los “lipid rafts” y por otro lado, los datos de las fracciones 8, 9 y 10, representativos de regiones de membrana no-“raft”. Los datos se expresan como μg de esteroide por mg de proteína. En células control, el contenido de colesterol en “lipid rafts” fue aproximadamente 8 veces mayor que en las fracciones de membrana no-“raft” (Tabla 6). El tratamiento con haloperidol a cualquiera de las concentraciones utilizadas redujo considerablemente el contenido de colesterol en los “lipid rafts”, pero no provocó cambios reseñables en otras fracciones de membrana (Tabla 6). Cabe aclarar que en las células tratadas con haloperidol los esteroides cuantificados como colesterol podrían no corresponderse exclusivamente con éste, sino que no se puede descartar la presencia de zimosterol en estos datos, puesto que no es posible resolver correctamente estos dos esteroides mediante HPLC. El inhibidor también causó la acumulación de 8,14-colestadien-3 β -ol en ambas regiones de membrana, siendo tales acumulaciones más acusadas cuanto mayor es la dosis de haloperidol utilizada (Tabla 6). En presencia de haloperidol también se detectó 7-DHC en ambas regiones de membrana, pero a concentraciones mucho más bajas que los otros esteroides (Tabla 6). En “lipid rafts”, el 7-DHC y el 8,14-colestadien-3 β -ol son incapaces de mantener la concentración de esteroides en estos microdominios de membrana.

Finalmente, el tratamiento conjunto del haloperidol con colesterol libre evitó la disminución en los niveles de colesterol en los “lipid rafts” y previno, considerable aunque no totalmente, la acumulación de 8,14-colestadien-3 β -ol en ambas regiones en relación a las células incubadas en presencia exclusiva de haloperidol (Tabla 6). En el caso de la coincubación del haloperidol con LDL, transportador fisiológico de colesterol a las células, obtuvimos resultados inesperados. A pesar de que las LDL son capaces de evitar la reducción en el contenido de colesterol en los “lipid raft” por acción del haloperidol, no lo hacen tan eficazmente como el colesterol libre (sobre todo en el caso del haloperidol 50 μM), y tampoco impiden la incorporación de 8,14-colestadien-3 β -ol a estas fracciones (Tabla 6). Por tanto, el colesterol libre sería más eficaz que el LDL-colesterol a la hora de evitar los efectos del haloperidol.

Resultados

	Colesterol ^a		8,14-colestadien-3 β -ol		7-DHC	
	Raft	No-raft	Raft	No-raft	Raft	No-Raft
<i>Control</i>	334 \pm 55,0	44,5 \pm 6,0	-	-	-	-
<i>Haloperidol 10 μM</i>	236 \pm 18,8*	39,5 \pm 6,0	12,6 \pm 1,6	3,0 \pm 4,6	0,076 \pm 0,056	0,011 \pm 0,006
<i>Haloperidol 10 μM + Colesterol</i>	397 \pm 27,0†	48,5 \pm 9,9	3,8 \pm 1,0*	0,3 \pm 0,4	0,065 \pm 0,046	0,017 \pm 0,012
<i>Haloperidol 10 μM + LDL</i>	354 \pm 40,7†	60,5 \pm 10,8	8,6 \pm 4,2	1,8 \pm 2,0	0,049 \pm 0,035	0,017 \pm 0,013
<i>Haloperidol 50 μM</i>	204 \pm 49,6 **	39,6 \pm 14,1	43,1 \pm 12,0	8,1 \pm 3,6	0,082 \pm 0,081	0,004 \pm 0,005
<i>Haloperidol 50 μM + Colesterol</i>	407 \pm 70,3‡	53,0 \pm 17,3	8,0 \pm 0,6‡	3,1 \pm 1,5	0,099 \pm 0,021	0,006 \pm 0,006
<i>Haloperidol 50 μM + LDL</i>	319 \pm 59,9	46,5 \pm 14,3	32,2 \pm 14,2	5,2 \pm 0,8	0,048 \pm 0,045	0,004 \pm 0,006

Tabla 6. Efecto del haloperidol sobre la composición en esteroides de las distintas fracciones de membrana. En la tabla se muestra el contenido de cada uno de los esteroides indicados en las fracciones de los "lipid-rafts" (fracciones 2 y 3) y no-"raft" (fracciones 8, 9 y 10) de la membrana plasmática de células SH-SY5Y tratadas durante 24 h en las condiciones descritas. Los datos se expresan en μ g de esteroide por mg de proteína en media \pm DE (n=3). Las comparaciones estadísticas se realizaron frente a las células control (incubadas en LPDS) (* $p < 0.05$; ** $p < 0.02$); frente a haloperidol 10 μ M († $p < 0.05$); o frente a haloperidol 50 μ M (‡ $p < 0.05$); —, no detectable. ^a Es posible que en los tratamientos con haloperidol, parte del contenido de colesterol sea, en realidad, zimosterol.

6.2. Efecto del haloperidol sobre la acumulación de colesterol en el interior celular

Según los resultados anteriores, las LDL son menos eficaces que el colesterol libre a la hora de evitar los efectos del haloperidol sobre la composición en esteroides en los "lipid rafts". Estas lipoproteínas no donan el colesterol que contienen directamente a la membrana plasmática, sino que previamente se internalizan en la célula por endocitosis mediada por receptor. Por este motivo, nos planteamos el estudio del transporte intracelular de colesterol cuando las células se incuban con haloperidol en presencia de LDL-colesterol. Para ello incubamos células SH-SY5Y y 3T3-L1 en LPDS solo (control) y con haloperidol 10 ó 50 μ M sólo o con LDL-colesterol 30 μ g/ml marcadas con Dil (Dil-LDL). Además, se tiñó el contenido de colesterol libre con filipina y se detectó mediante inmunocitoquímica la presencia de LAMP-2 (proteína específica de lisosomas tardíos). En las imágenes de microscopía de fluorescencia observamos que el tratamiento con haloperidol provoca una acumulación del colesterol libre en el interior celular en lisosomas, dada la colocalización que existe entre la fluorescencia correspondiente a la filipina y a LAMP-2 (Fig 35A). Por su parte, la fluorescencia de las Dil-LDL también se detecta en este emplazamiento celular. Estos resultados apuntan a que el haloperidol, además de inhibir la síntesis de colesterol, estaría bloqueando el transporte intracelular del mismo evitando que llegue y se incorpore a la membrana plasmática.

Quisimos observar si concentraciones mayores de LDL eran capaces de evitar los efectos del haloperidol. Para ello, incubamos células 3T3-L1 en LPDS solo (control), y con haloperidol 10 μ M solo o con distintas concentraciones de Dil-LDL superiores a las

anteriormente utilizadas (60 y 120 $\mu\text{g/ml}$). La elección de las células 3T3-L1 para observar el comportamiento celular en estas circunstancias se hizo en base a que los efectos del haloperidol en estas células fueron los mismos que en células SH-SY5Y y además, las 3T3-L1 presentaron la ventaja de ser más resistentes al procesamiento al que se someten las células en las técnicas de marcaje utilizadas. Observamos que tanto mayor la concentración de Dil-LDL utilizada, mayor era la acumulación intracelular de colesterol libre y de Dil (Fig 35B). Estos resultados confirman, en otra línea celular, que el haloperidol interfiere en el transporte intracelular de colesterol, lo cual explica que las LDL incluso a elevadas concentraciones no puedan evitar, completamente, los efectos del haloperidol. Esto se debe a que para que el colesterol de las LDL llegue a la membrana, estas lipoproteínas deben internalizarse primero y viajar a la membrana después.

Por último, y para confirmar nuestras observaciones de que el haloperidol inhibía el tráfico intracelular, tratamos las células con otro inhibidor exclusivo de la síntesis de colesterol, como es la lovastatina. Para ello, incubamos células 3T3-L1 en LPDS solo (control), con lovastatina 10 μM en presencia de mevalonato (para obviar los efectos de la ausencia de grupos prenilo) y Dil-LDL 30 $\mu\text{g/ml}$ o con lovastatina, Dil-LDL y haloperidol 10 μM durante 20 h. Después, teñimos las células con filipina para marcar el colesterol libre y detectamos mediante fluorescencia la proteína LAMP-2 (Fig 35C). El tratamiento con lovastatina y Dil-LDL no produjo acumulaciones intracelulares importantes, mientras que si a este tratamiento se le suma la presencia de haloperidol 10 μM , aparecen las acumulaciones lisosomales observadas anteriormente (Fig 35).

6.3. Efecto del haloperidol sobre la presencia y distribución del gangliósido GM1 en “lipid rafts”

Como ya habíamos observado, los inhibidores de la colesterologénesis, alteran la presencia y distribución de componentes específicos de los “lipid rafts” como el GM1 (Fig 27). Por este motivo, quisimos comprobar si el haloperidol era capaz de causar un efecto semejante. Para ello, las células 3T3-L1 se incubaron en LPDS solo (control), o con haloperidol 10 y 50 μM , y se marcaron con filipina y Chtx-FITC, para la detección de colesterol libre y el gangliósido GM1, respectivamente. En las células control se observaron zonas de colocalización entre el colesterol y el GM1 (Merge) consideradas zonas de “lipid rafts” (Fig 36). Mientras, el tratamiento con haloperidol a ambas dosis provocó una disminución tanto en la presencia en membrana de colesterol como de GM1 y una pérdida de colocalización entre ambos, y por tanto, una deslocalización del GM1 de las regiones de “lipid rafts” (Fig 36). Estos resultados ponen de manifiesto que, al igual que otros inhibidores (Fig 27), el haloperidol conduce a una desestructuración de los “lipid rafts” provocando la deslocalización de componentes característicos de estas regiones.

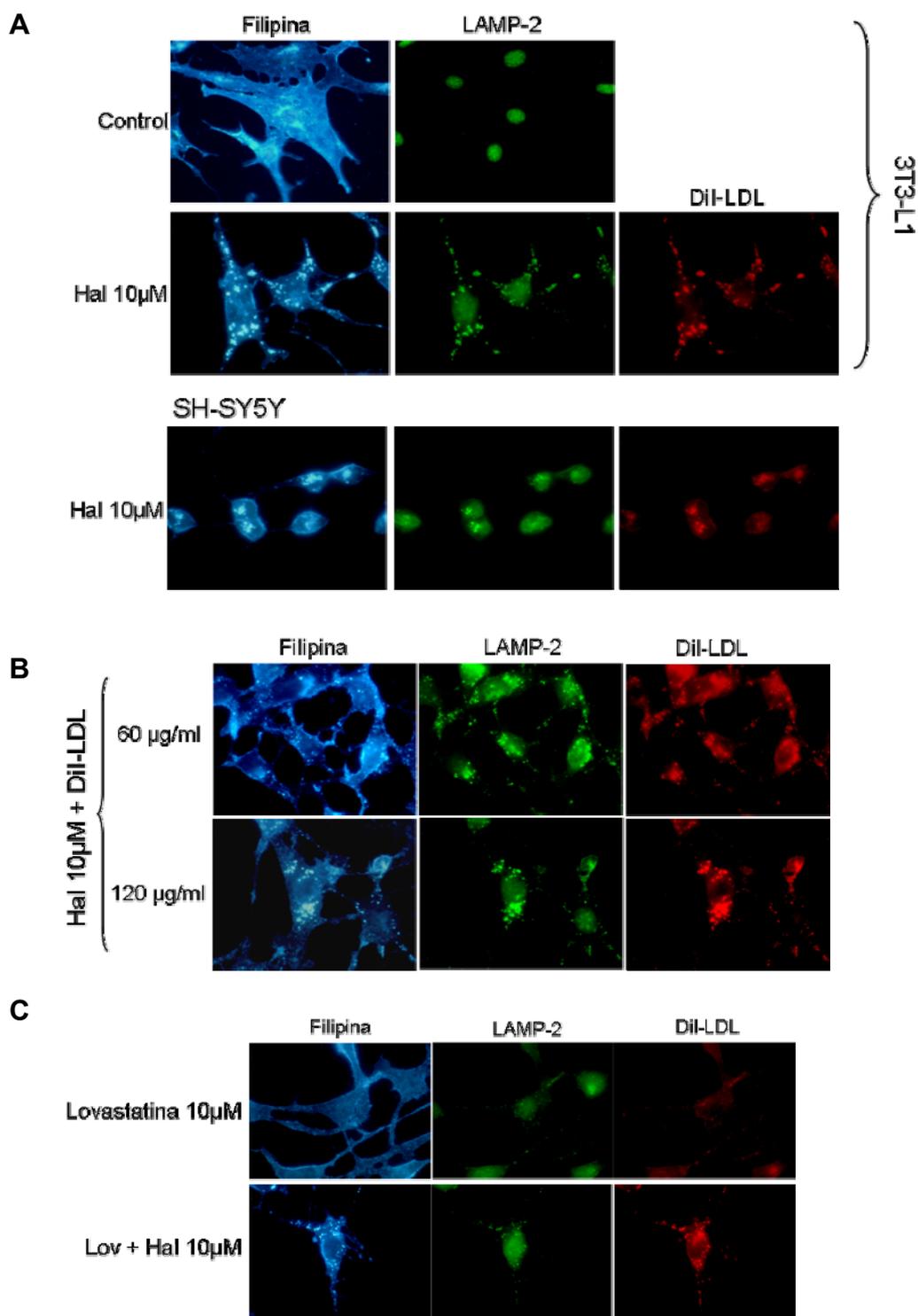


Figura 35. Efecto del haloperidol sobre el transporte intracelular de colesterol. A. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células 3T3-L1 y SH-SY5Y incubadas en LPDS solo (control) o con haloperidol 10 µM con DiI-LDL en las que se observa el contenido y distribución del colesterol libre (filipina), y las LDL (DiI-LDL) y la proteína lisosomal LAMP-2. B. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células 3T3-L1 incubadas con haloperidol 10 µM y concentraciones de DiI-LDL mayores de 30 µg/ml en las que se observa el contenido y distribución de colesterol libre y LDL y la proteína LAMP-2. C. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células 3T3-L1 incubadas con lovastatina y DiI-LDL en ausencia y presencia de haloperidol 10 µM en las que se observa el contenido y distribución de colesterol libre y LDL y la proteína LAMP-2. En todos los casos, las células que se muestran son representativas de la preparación en todos los casos. Las imágenes se tomaron a 60 aumentos. Hal, haloperidol; Lov, lovastatina.

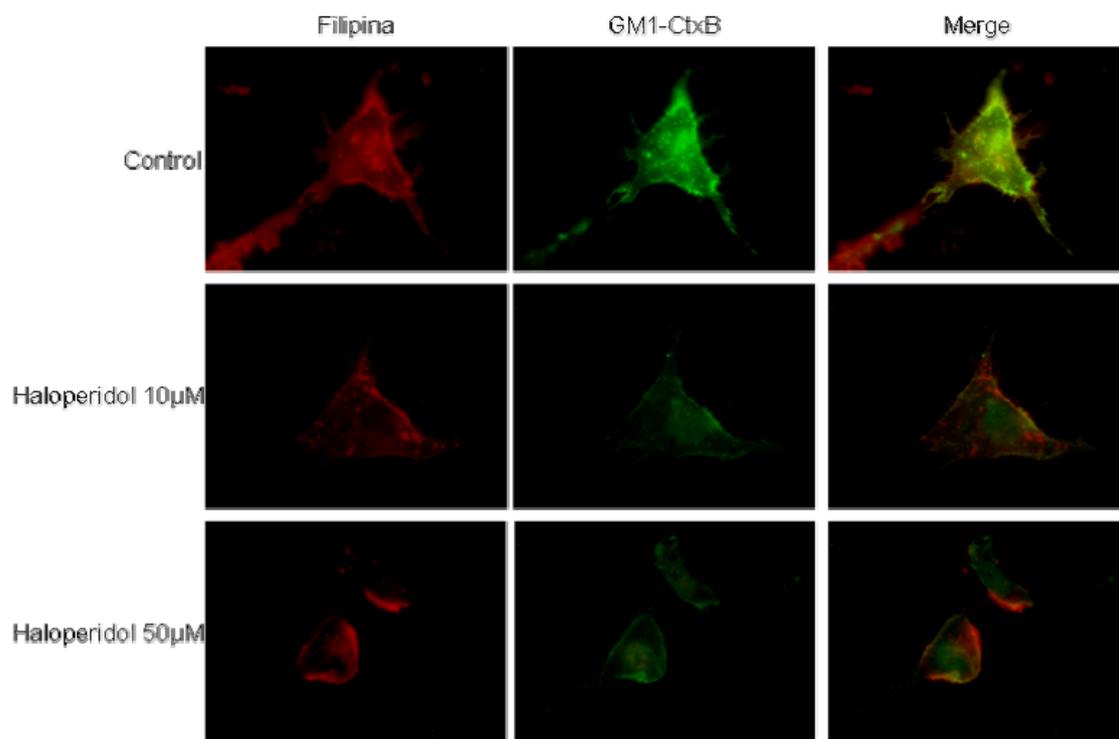


Figura 36. Efecto del haloperidol sobre la presencia y distribución del gangliósido GM1. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células 3T3-L1 incubadas en LPDS solo (control) o con haloperidol 10 y 50 μM donde se observan los niveles y distribución del colesterol libre (filipina) y el GM1 (Chtx-FITC) por separado o solapadas (Merge). Las células que se muestran fueron representativas del total de la preparación en todos los casos. Las imágenes se tomaron a 60 aumentos. El color de la filipina ha sido manipulado para una mejor percepción de los resultados.

6.4. Efecto del haloperidol sobre la distribución de flotilina-1 en las distintas fracciones del gradiente

Acabamos de mostrar que el haloperidol es capaz de alterar la composición lipídica de la membrana plasmática y, en especial, de zonas de “lipid rafts” (Tabla 6), así como la localización de componentes de estos microdominios como el GM1 (Fig 36). Anteriormente hemos mostrado las alteraciones en la composición proteica de los “lipid rafts” por modificación del contenido y distribución de proteínas específicas de estos dominios, como la caveolina-1, con el uso de inhibidores de la colesterologénesis (Fig 28). En cerebro, la presencia de caveolina-1 es indetectable, pero sí se detecta flotilina-1, proteína considerada como marcador de “lipid rafts” en tejido y células cerebrales (Bickel et al., 1997). Pues bien, en las células SH-SY5Y detectamos la flotilina-1 en las fracciones 2 y 3, que corresponden a los “lipid rafts” (Fig 37B), mientras que la presencia del RTf sólo se detectó en fracciones de membrana no-“raft” de nuestro gradiente de densidad (Fig 37A). Para determinar el efecto del haloperidol sobre el contenido y distribución de la flotilina-1 en los “lipid rafts” incubamos las células SH-SY5Y en medio con LPDS solo (células control) o con haloperidol 10 y 50 μM solo o con colesterol libre o en forma de LDL, ambos a la concentración de 30 $\mu\text{g/ml}$ durante 24 h. Posteriormente, las células se procesaron para el aislamiento de las distintas fracciones de membrana plasmática y se analizaron, mediante western-blot, los niveles de flotilina-1 en las distintas fracciones del gradiente (Fig 37B y C). El tratamiento con haloperidol 10 y 50 μM provocó un descenso en el

contenido de flotilina-1 en las fracciones de "lipid rafts"; mientras que el tratamiento conjunto con colesterol (libre o en forma de LDL) evitó tales efectos (Fig 37B y C).

7. Efectos del haloperidol sobre la funcionalidad de la señalización por insulina en células SH-SY5Y

Existen evidencias de que el haloperidol reduce la fosforilación de Akt en cultivos de células neuronales (Dai et al., 2007; Ukai et al., 2004) y que afecta la captación de glucosa (Dwyer et al., 1999). Nosotros hemos descrito la alteración de la señalización por insulina como consecuencia de la inhibición de la colesterogénesis por parte de varios inhibidores, y llegado el momento, nos propusimos el estudio del efecto del haloperidol en este sentido dada la importancia del RI en el cerebro, por su participación en procesos de supervivencia neuronal y en los procesos sinápticos implicados en el aprendizaje y la memoria (van der Heide et al., 2006).

7.1. Efecto del haloperidol sobre la actividad del receptor de insulina

En primer lugar, determinamos los efectos del haloperidol sobre la actividad y funcionalidad del RI en células SH-SY5Y. Para ello, incubamos estas células en LPDS solo (células control), o con haloperidol 10 ó 50 μM en ausencia y presencia de colesterol libre o en forma de LDL 30 $\mu\text{g/ml}$ durante 24 h. A continuación, estimulamos la vía del RI con insulina 100 nM durante 10 min, aislamos las distintas fracciones de membrana, precipitamos cantidades iguales de proteína con TCA 10% y analizamos, mediante western-blot, los niveles de p-Tyr y de la subunidad β del RI en las fracciones 2 y 3 del gradiente, correspondientes a fracciones de "lipid rafts". El tratamiento con haloperidol 10 μM no redujo los niveles de RI β en "lipid rafts", aunque sí lo hizo a la dosis de 50 μM (Fig 38B). A 50 μM , el efecto del haloperidol es evitado por el colesterol libre. Sin embargo, las LDL no fueron capaces de impedir el descenso en los niveles de RI provocado por el tratamiento con haloperidol 50 μM (Fig 38B).

En cuanto a la fosforilación del RI en tirosina (p-Tyr) observamos que, efectivamente, la estimulación con insulina provocó una fosforilación del RI en las células control, y que esta fosforilación disminuyó a cualquiera de las dosis de haloperidol empleadas (Fig 38B). Al coincubar las células con haloperidol a cualquier dosis con colesterol libre, éste fue capaz de evitar el efecto inhibitorio del haloperidol sobre la fosforilación y activación del RI (Fig 38). En el caso de las LDL, también evitaron el efecto del haloperidol 10 μM . Sin embargo, a las LDL no impidieron el efecto del haloperidol la dosis de 50 μM (Fig 38).

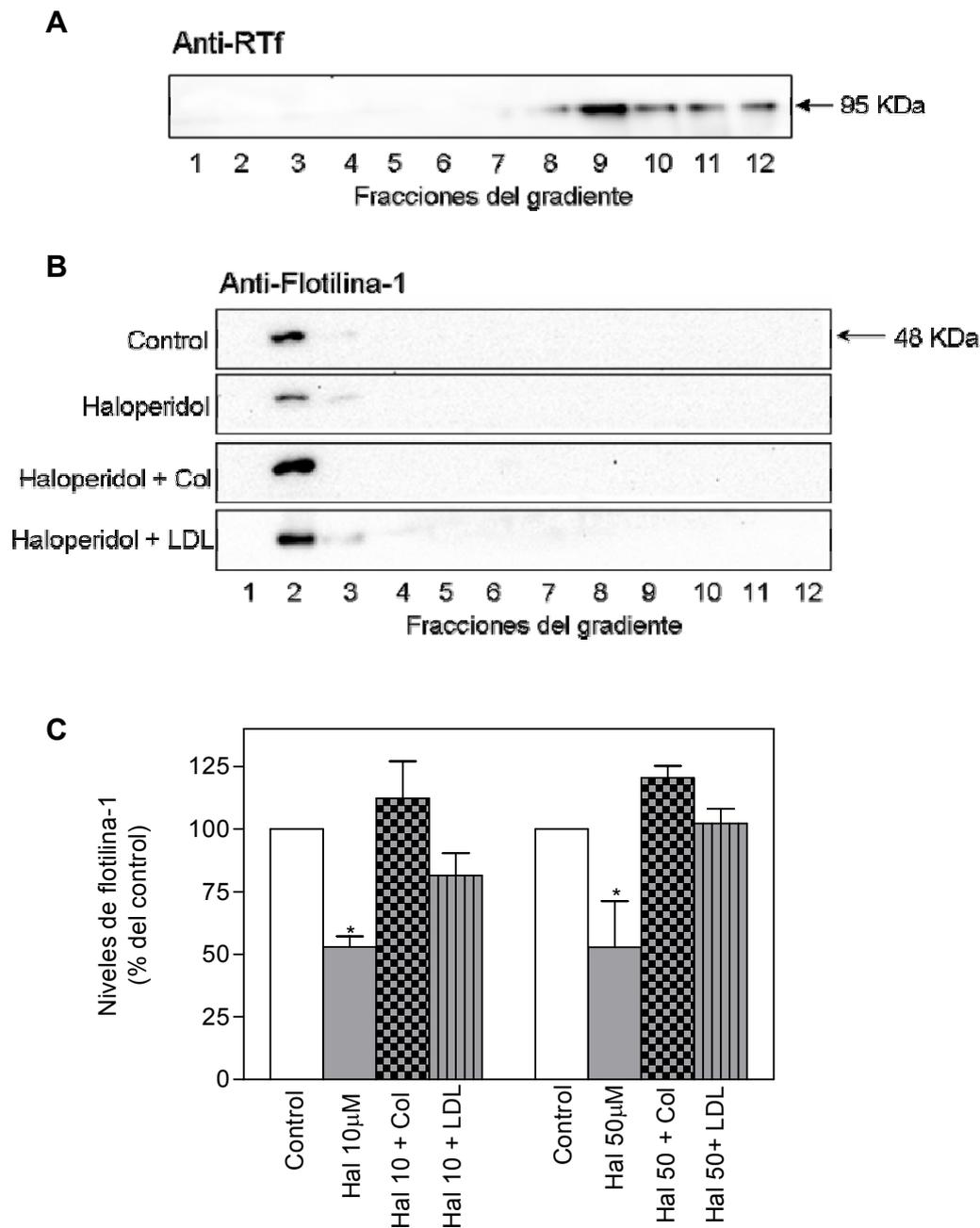
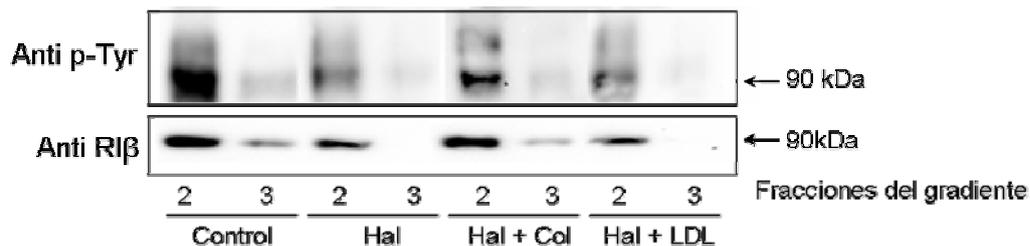


Figura 37. Efecto del haloperidol sobre el contenido de flotilina-1 en "lipid rafts". A. Western-blot del receptor de transferrina (RTf) en las distintas fracciones del gradiente de células SH-SY5Y. B. Western-blot de la flotilina-1 en las distintas fracciones del gradiente de células SH-SY5Y incubadas en LPDS solo (células control), o con haloperidol 10 µM solo o con colesterol libre o LDL, ambos a la concentración de 30 µg/ml. Los western-blot son representativos de tres experimentos independientes. C. Cuantificación por densitometría del contenido en flotilina-1 en "lipid rafts" en las condiciones que se indican. Los datos se expresan como media ± DE y % del control (n=3). Las comparaciones estadísticas se establecen frente a las células control (* $p < 0,05$). Hal 10, haloperidol 10 µM; Hal 50, haloperidol 50 µM; Col, colesterol.

A



B

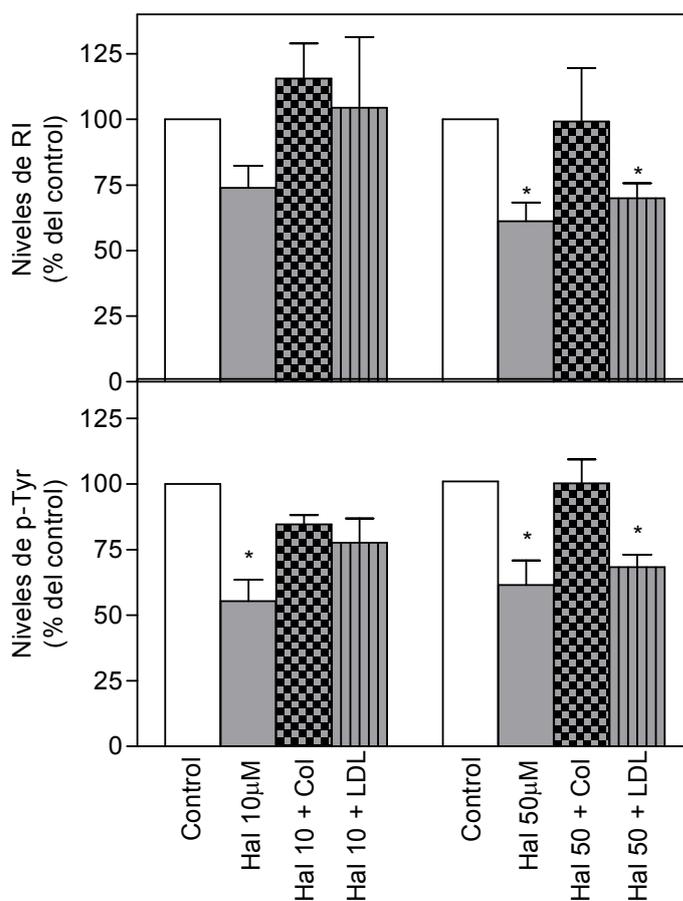


Figura38. Efecto del haloperidol sobre la actividad del RI en células SH-SY5Y. A. Western-blot de los niveles de tirosina fosforiladas (p-Tyr) del RI y de su subunidad β (RI β) en las fracciones 2 y 3 del gradiente ("lipid rafts") de células SH-SY5Y incubadas en LPDS solo (control) o con haloperidol 10 μ M en ausencia o presencia de colesterol libre o en forma de LDL, ambos a la concentración de 30 μ g/ml, estimuladas con insulina. Se muestran western-blot representativos de al menos tres experimentos independientes. B. Cuantificación por densitometría de los niveles de RI β total y fosforilado en tirosina. Los datos se expresan como % del control y como media \pm DE (n=3). Las comparaciones estadísticas se establecen frente al control (* $p < 0,05$). Hal 10, haloperidol 10 μ M; Hal 50, haloperidol 50 μ M; Col, colesterol.

7.2. Efecto del haloperidol sobre el contenido de Fyn en los “lipid rafts”

Con el uso de otros inhibidores de la colesterogénesis hemos mostrado anteriormente alteraciones en el contenido de la proteína acopladora Fyn en los “lipid rafts”, asociada a una inhibición de la señalización por insulina (Fig 30). Puesto que el haloperidol disminuye la actividad del RI en células SH-SY5Y (Fig 38), quisimos analizar si afectaba la expresión de Fyn en los “lipid rafts”. Para ello, tratamos y procesamos las células como se describe en el apartado anterior (7.1) y analizamos los niveles de Fyn en cada una de las fracciones del gradiente. El haloperidol, a ambas dosis (10 y 50 μM) redujo considerablemente los niveles de Fyn en los “lipid rafts” (Fig 39). Tanto el colesterol libre como en forma de LDL evitó los efectos del haloperidol desplazando Fyn a las fracciones no “raft” (Fig 39).

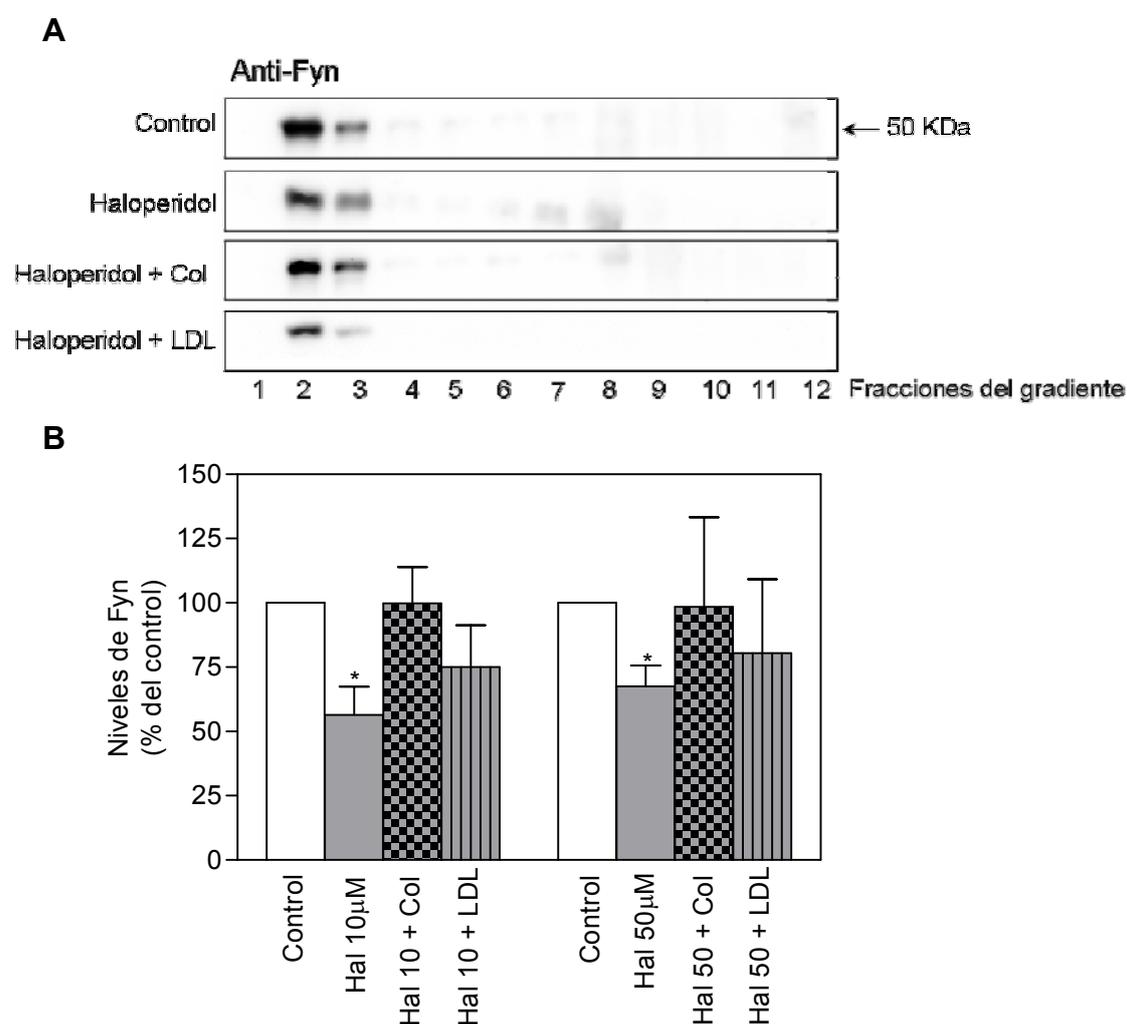


Figura 39. Efecto del haloperidol sobre la proteína acopladora Fyn en “lipid rafts”. A. Western-blot de Fyn en las distintas fracciones del gradiente de células SH-SY5Y incubadas en LPDS solo (control) o con haloperidol 10 μM en ausencia o presencia de colesterol libre o en forma de LDL (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y estimuladas con insulina. Los western-blot de la figura son representativos de al menos 3 experimentos independientes. B. Cuantificación por densitometría de los niveles de Fyn en las fracciones 2 y 3 del gradiente (“lipid rafts”). Los datos se expresan como % del control estimulado con insulina (LPDS) y como media \pm DE (n=3). Las comparaciones estadísticas se establecen frente a las células control (* $p < 0,05$). Hal 10, haloperidol 10 μM ; Hal 50, haloperidol 50 μM ; Col, colesterol.

7.3. Efecto del haloperidol sobre la actividad de la vía de PKB/Akt

La insulina activa la vía de Akt, crítica para la supervivencia neuronal, la plasticidad sináptica y el aprendizaje (van der Heide et al., 2006). Al ser Akt una de las proteínas efectoras de la señalización del RI nos propusimos comprobar ahora su funcionalidad en presencia de este antipsicótico. Para ello, las células SH-SY5Y se incubaron en LPDS solo (células control) o con haloperidol 10 μ M en ausencia y presencia de colesterol libre o en forma de LDL 30 μ g/ml durante 24 h y después se estimuló la vía de Akt con insulina 1 μ M (Fig 40A). Transcurrido el tiempo de tratamiento se analizaron los niveles de Akt fosforilada en la serina 473 (p-Akt), así como los niveles de proteína total. En células control, la insulina provocó un aumento en la fosforilación y, por tanto, en la actividad de Akt (Fig 40A), mientras que esta fosforilación disminuyó de manera notable en presencia de haloperidol 10 μ M (Fig 40A). La coincubación de las células con haloperidol y colesterol libre, pero no con LDL, evitó los efectos del haloperidol (Fig 40A). Además, en coincubaciones de las células con haloperidol y concentraciones más elevadas de LDL (Fig 40B), estas lipoproteínas tampoco fueron capaces de contrarrestar completamente los efectos del haloperidol sobre la fosforilación de Akt en células SH-SY5Y estimuladas con insulina.

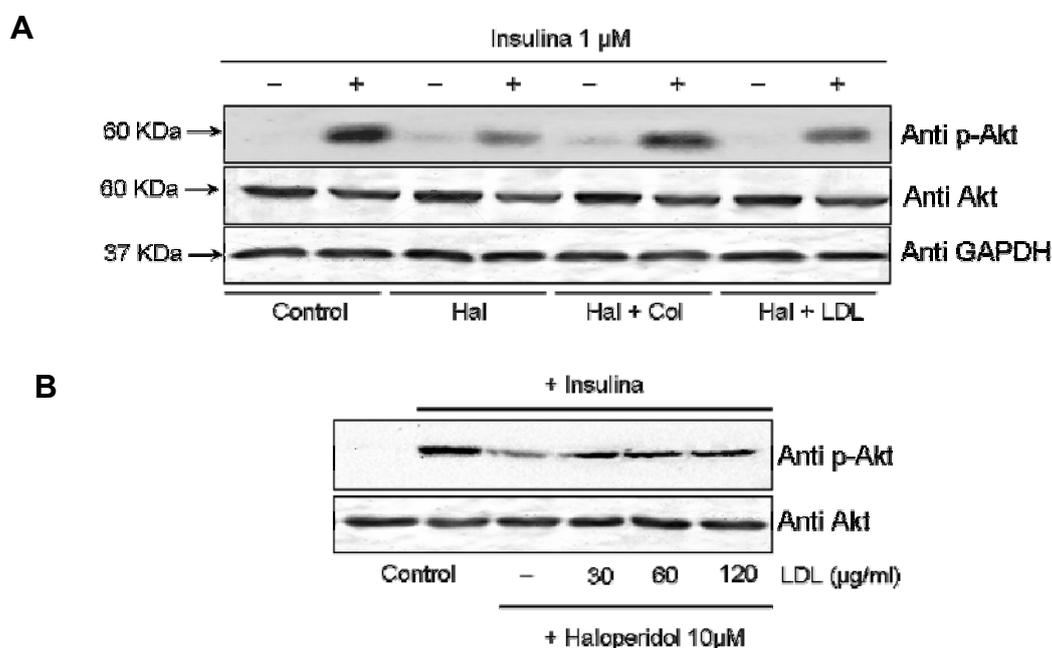


Fig 40. Efecto del haloperidol sobre la actividad de la vía de insulina/Akt en células SH-SY5Y. A. Western-blot de p-Akt y Akt total en células SH-SY5Y incubadas en LPDS solo (control) o con haloperidol 10 μ M en ausencia o presencia de colesterol libre o en forma de LDL 30 μ g/ml y estimuladas (+) o no (-) con insulina. Utilizamos GAPDH como control de carga. B. Western-blot de p-Akt y Akt de células SH-SY5Y incubadas en LPDS solo (control) o con haloperidol 10 μ M solo o en compañía de distintas concentraciones de LDL (30, 60 o 120 μ g/ml) y estimuladas con insulina. El control negativo de la estimulación de la vía fueron células incubadas en LPDS no tratadas con insulina. En ambos casos, los western-blots son representativos de al menos tres experimentos realizados de manera independiente.

Todos los resultados anteriores apuntan a que el haloperidol altera la señalización mediada por el receptor de insulina en las células SH-SY5Y como resultado de la inhibición de la biosíntesis de colesterol. Esto conduce a la disminución de los niveles de colesterol en "lipid rafts", y a la acumulación del intermediario 8,14-colestadien-3 β -ol, que no es capaz de sustituir al colesterol en sus funciones en estas regiones. Además afecta a la presencia en estos microdominios de componentes característicos de los "lipid rafts", como son la flotilina-1 y el gangliósido GM1. Esta conclusión viene reforzada por el hecho de que el aporte de colesterol libre a las células tratadas con haloperidol neutraliza los efectos del antipsicótico sobre la señalización a partir del RI. Sin embargo, el colesterol suministrado en forma de LDL, que es captado por endocitosis mediada por receptor, fue mucho menos efectivo que el colesterol libre a la hora de evitar los efectos del haloperidol, sobre todo a la dosis de 50 μ M. Este fenómeno se atribuye al hecho de que el haloperidol, además de inhibir la síntesis de colesterol, interfiere en el transporte intracelular del mismo, de manera que una vez captado por las células, el colesterol procedente de las LDL ve dificultado su transporte a la membrana y su incorporación a los "lipid rafts" cuando la célula está sometida al tratamiento con haloperidol.

Además de la señalización mediada por receptores tirosina quinasa, existen otros sistemas de transducción de señales asociados a los "lipid rafts"; tal es el caso de la señalización mediada por GPCRs (Pike, 2003). En este sentido, el haloperidol, que como ya hemos visto, altera la estructura de los "lipid rafts" y la funcionalidad de la señalización mediada por el RI, se ha relacionado también con la alteración de la funcionalidad de proteínas G (Kelley and Hennekam, 2000).

8. Efectos del haloperidol sobre la señalización mediada por somatostatina en células SH-SY5Y

Estudios previos con haloperidol administrado en ratas revelan una disminución en la expresión de receptores de somatostatina en el cerebro de estos animales (Perez-Oso et al., 1989; Perez-Oso et al., 1990). Nosotros nos planteamos profundizar en el estudio del efecto del haloperidol sobre esta señalización en relación a su capacidad para inhibir la colesterogénesis y, en consecuencia, conducir a una desestructuración de microdominios de membrana donde residen muchos GPCRs, entre los que se encuentran los receptores de somatostatina (Chini and Parenti, 2004).

8.1. Efecto del haloperidol sobre la unión de la somatostatina a su receptor

En primer lugar quisimos determinar si la capacidad de la somatostatina para unirse a su receptor permanecía intacta en células tratadas con haloperidol. Para ello realizamos ensayos de unión del agonista a su receptor ("binding") en membranas de células SH-SY5Y incubadas durante 24 h en LPDS solo (células control) o con haloperidol 50 μ M. Tanto células control como tratadas con haloperidol mostraron el mismo patrón de unión específica de SRIF-Tyr¹¹-I¹²⁵, tanto en ausencia como en presencia de concentraciones crecientes de SRIF sin marcar (SRIF fría) (Fig 41). Estos resultados apuntan a que la unión de la somatostatina a su receptor no se encuentra alterada por efecto del haloperidol. Además, el haloperidol no modificó el número de receptores de somatostatina (B_{max}), ni la afinidad del ligando a su receptor (K_d) respecto a las células control (Tabla 7).

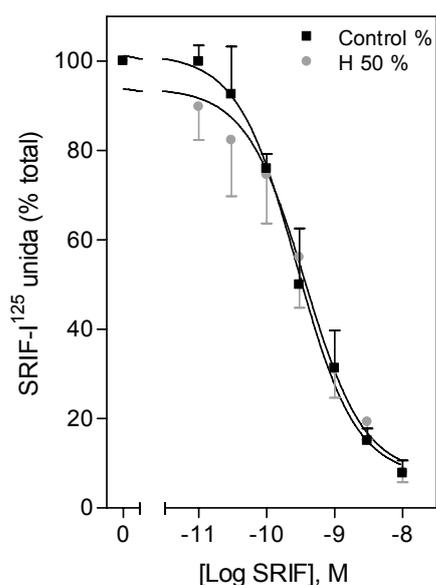


Figura 41. Efecto del haloperidol sobre la unión de la somatostatina a su receptor. La gráfica muestra la somatostatina (SRIF-¹²⁵) unida a su receptor en presencia de distintas concentraciones de SRIF sin marcar en células SH-SY5Y incubadas durante 24 h en LPDS solo (control) o con haloperidol 50 μ M (H50). Los datos se expresan como % del total y como media \pm DE de al menos tres experimentos independientes realizados por duplicado.

	Kd	Bmax
Control	0,56 \pm 0,26	275,0 \pm 4,1
Haloperidol	0,65 \pm 0,15	368,1 \pm 82,0

Tabla 7. Efecto del haloperidol sobre el número y la afinidad de los receptores de somatostatina. Se indican los parámetros Kd y Bmax calculados a partir de las curvas de “binding” mediante análisis de Scatchard en células SH-SY5Y incubadas durante 24 h en LPDS solo (control) o con haloperidol 50 μ M. Los datos se expresan como media \pm DE de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Kd, constante de disociación (expresada en nM); Bmax, capacidad máxima de unión (expresada en femtomoles de SRIF unida por mg de proteína).

8.2. Efecto del haloperidol sobre la actividad de la adenilato ciclasa

A pesar de que el haloperidol no provocó ningún efecto sobre la capacidad de unión de la SRIF a su receptor, quisimos determinar si el haloperidol alteraba la señalización mediada por SRIF. Se sabe que los sst son GPCRs que regulan negativamente la actividad de la adenilato ciclasa (ver Fig 5). Es por esto que analizamos la actividad basal y estimulada con forskolina de la adenilato ciclasa, así como la inhibición de la enzima mediada por SRIF en membranas de células SH-SY5Y mantenidas en LPDS solo (células control) o con haloperidol 50 μ M en ausencia o presencia de colesterol libre 30 μ g/ml. Como se indica en la Tabla 8, el tratamiento con haloperidol provocó un descenso tanto de la actividad basal como de la inhibición por SRIF de la AC, mientras que no se observaron diferencias significativas en la inhibición por SRIF de la AC cuando ésta se encuentra estimulada con FK (Tabla 8). Sin embargo, hubo un aumento en la actividad de la AC ante la estimulación con FK. Por último, el tratamiento conjunto de haloperidol con colesterol libre evitó el descenso de la actividad de la AC, así como la disminución en la inhibición de la AC por SRIF, pero fue incapaz de evitar el efecto del haloperidol sobre el aumento en la actividad de la AC ante la estimulación con FK (Tabla 8).

Actividad de AC	Control	Haloperidol	Haloperidol + Colesterol
Actividad basal	82,2 ± 0,8	64,5 ± 4,9 *	86,9 ± 8,1 †
+10 ⁻⁴ M SRIF	57,3 ± 2,0	50,6 ± 8,9	53,5 ± 11,4
% Inhibición de la actividad basal por SRIF	30,3 ± 3,2	21,9 ± 6,7 *	38,8 ± 7,4 †
+10 ⁻⁵ M FK	449 ± 167	598 ± 91,4	694 ± 45,0
+10 ⁻⁵ M FK + 10 ⁻⁴ M SRIF	328 ± 85,0	378 ± 34,3	441 ± 15,9
% Inhibición por SRIF de la actividad estimulada por FK	25,4 ± 8,8	36,6 ± 3,9	36,4 ± 1,8
Veces de estimulación por FK sobre la actividad basal	5,5 ± 2,1	9,3 ± 0,7 *	8,0 ± 0,2 *

Tabla 8. Efecto del haloperidol sobre la actividad adenilato ciclasa. En la tabla se indica la actividad de la adenilato ciclasa (AC) como pmol AMPc por min y por mg proteína en ausencia (actividad basal) o presencia de FK (10⁻⁵ M) sola o con SRIF (10⁻⁴ M) en membranas de células SH-SY5Y incubadas durante 24 h en LPDS solo (células control) o con haloperidol 50 µM en ausencia o presencia de colesterol libre 30 µg/ml. Los datos se expresan como media ± DE de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las comparaciones estadísticas se realizaron frente al control (* $p < 0,05$) o frente al tratamiento con haloperidol († $p < 0,05$). SRIF, somatostatina; FK, forskolina.

9. Efecto del SKF 104976 sobre la expresión de la ciclina B1 en células MOLT-4

Estudios previos en nuestro laboratorio han observado el bloqueo del ciclo celular en la fase de G2/M por efecto de la inhibición de la biosíntesis de colesterol, tanto en células de linfoblastoma humano MOLT-4 como en células promielocíticas HL-60 (Fernandez et al., 2005; Martínez-Botas et al., 1999; Sanchez-Martin et al., 2007; Suarez et al., 2005). Este efecto, además, induce la diferenciación de las células HL-60 hacia neutrófilos (Sanchez-Martin et al., 2007). A pesar de que en nuestro modelo celular de la diferenciación a adipocitos en las células 3T3-L1 no observamos bloqueo alguno del ciclo celular ante la inhibición de la colesterogénesis durante la fase de expansión clonal, nos planteamos el estudio del mecanismo molecular por el cual la inhibición de la biosíntesis de colesterol impide a las células MOLT-4 y HL-60 progresar a través de la fase G2/M.

Dado que la ciclina B1 es quien determina la actividad de la Cdk1, quinasa que controla la transición de G2 a M, y que se ha observado previamente que la adición de colesterol estimulaba rápidamente la expresión de la ciclina B en células sometidas al tratamiento con SKF 104976 (Suarez et al., 2002), decidimos estudiar el promotor de esta ciclina. En primer lugar se clonó la secuencia promotora completa del gen de la ciclina B1 humana mediante amplificación por PCR utilizando unos cebadores específicos, y clonaje en el vector pGL3-Basic acoplado al gen de la luciferasa (apartado 25 de Material y Métodos). Después, con objeto de estudiar la actividad del pCycB1 en situaciones de inhibición de la colesterogénesis e identificar los elementos de respuesta implicados, construimos clones de distinta longitud, y por tanto, diferentes en cuanto a los elementos de respuesta que contienen, mediante deleciones

parciales del pCycB1 por digestión con enzimas de restricción con actividad exonucleasa (apartado 24 de Material y Métodos).

Para comenzar con el estudio de la actividad del pCycB1, transfectamos las células MOLT-4 con las diferentes construcciones del promotor de la ciclina B1 (pCycB) de distinta longitud en el vector pGL3-Basic acopladas al gen de la luciferasa (Fig 42A) y con plásmidos con un promotor constitutivo acoplado al gen de la renilla para normalizar los datos de actividad de luciferasa. Posteriormente, tratamos a las células con LPDS solo (control), con LDL-colesterol 60 µg/ml o con SKF 104976 3 µM solo o con LDL-colesterol 60 µg/ml durante 24 h. De manera indirecta, medimos, en un luminómetro, la expresión de luciferasa como indicativo de la actividad del pCycB1 en las distintas condiciones y los resultados obtenidos se corrigieron por la actividad renilla. El tratamiento con el SKF 104976 produjo un descenso de la actividad luciferasa/renilla que se evitó al incubar las células en presencia de LDL (Fig 42B). Cabe destacar que tanto las células transfectadas con el promotor completo como con los clones de mayor longitud (clon 4 y 5) (Fig 42A) y, por tanto, con mayor número de elementos de respuesta, presentaron una mayor actividad luciferasa/renilla que los clones 10, 8 y 14 (Fig 42B). Sin embargo, la respuesta al tratamiento siguió un mismo patrón de comportamiento en todos los casos exceptuando el de las células transfectadas con el clon 14 (Fig 42B), de menor longitud, que probablemente haya perdido la secuencia que responde a la inhibición de la síntesis de colesterol.

De los resultados obtenidos observamos que existe una regulación de la expresión de la ciclina B1 en respuesta al contenido de colesterol celular, donde la falta de colesterol por efecto de la inhibición de la lanosterol 14α-desmetilasa, provoca un descenso en la actividad del promotor mientras que las LDL evitan dicho efecto.

9.1. Búsqueda de posibles elementos de respuesta implicados en la regulación de la expresión de la ciclina B1 por esteroides

Una vez conocida la capacidad de respuesta del pCycB1 a cambios en el contenido de colesterol nos planteamos la búsqueda del elemento de respuesta implicado en tal regulación. Hemos visto que todos los clones, exceptuando el 14, responden a la falta de colesterol y a su reposición de un modo similar, disminuyendo y aumentando, respectivamente. Por tanto, supusimos que el elemento de respuesta en cuestión estaría localizado entre la secuencia del pCycB1 que se encuentra entre el clon 14 y el anterior, el clon 8. Realizamos una búsqueda exhaustiva en el TESS de los elementos presentes en dicha secuencia que presentaban una elevada probabilidad de unión a factores de transcripción. Así, encontramos que en torno a los -77 pb antes del inicio de la transcripción existía una secuencia (GAAGGGAGTG) con alta probabilidad de funcionar como elemento de respuesta para el factor de transcripción USF (Tabla 9), del que se conoce su implicación en la regulación de la expresión de la ciclina B1 en el ciclo celular (Cogswell et al., 1995).

<i>Factor</i>	<i>Sitio de comienzo</i>	<i>Longitud (pb)</i>	<i>Secuencia</i>	<i>La (índice de probabilidad)</i>
TFII-I; USF1	11	12	GAAGGGAGTG	22

Tabla 9. Secuencia encontrada como candidata de elemento de unión a USF en el pCyc B1. En la tabla se muestran los datos del TESS de la búsqueda de posibles elementos de respuesta en la secuencia comprendida entre el clon 8 y 14 del pCycB1 pertenecientes a una posible secuencia de unión para el factor de transcripción USF. De todas las 54 secuencias candidatas, la que se muestra es la que más probabilidad presentó para funcionar como un elemento de respuesta.

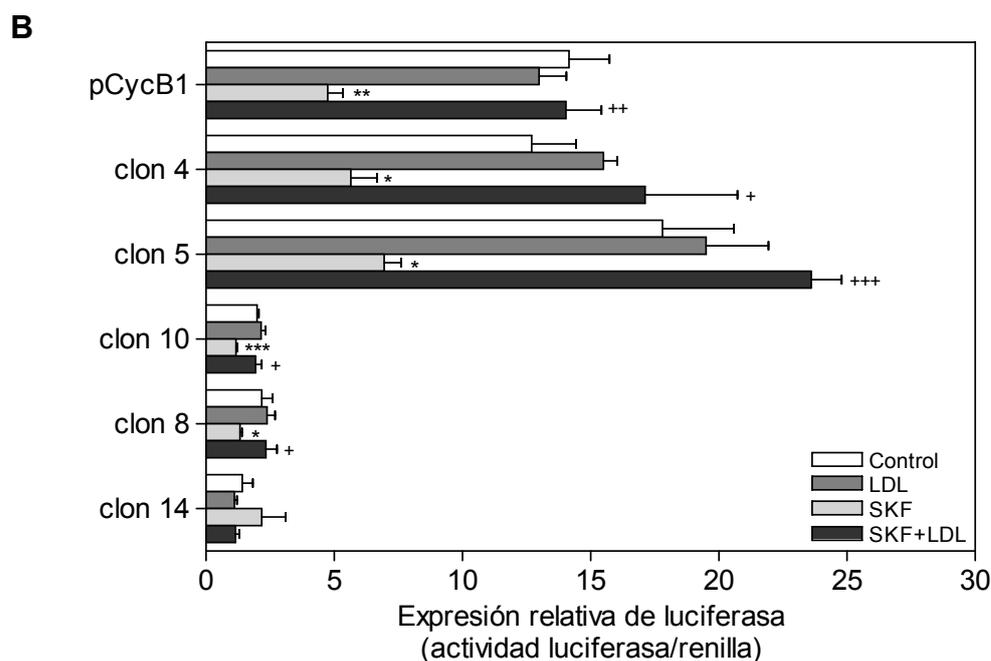
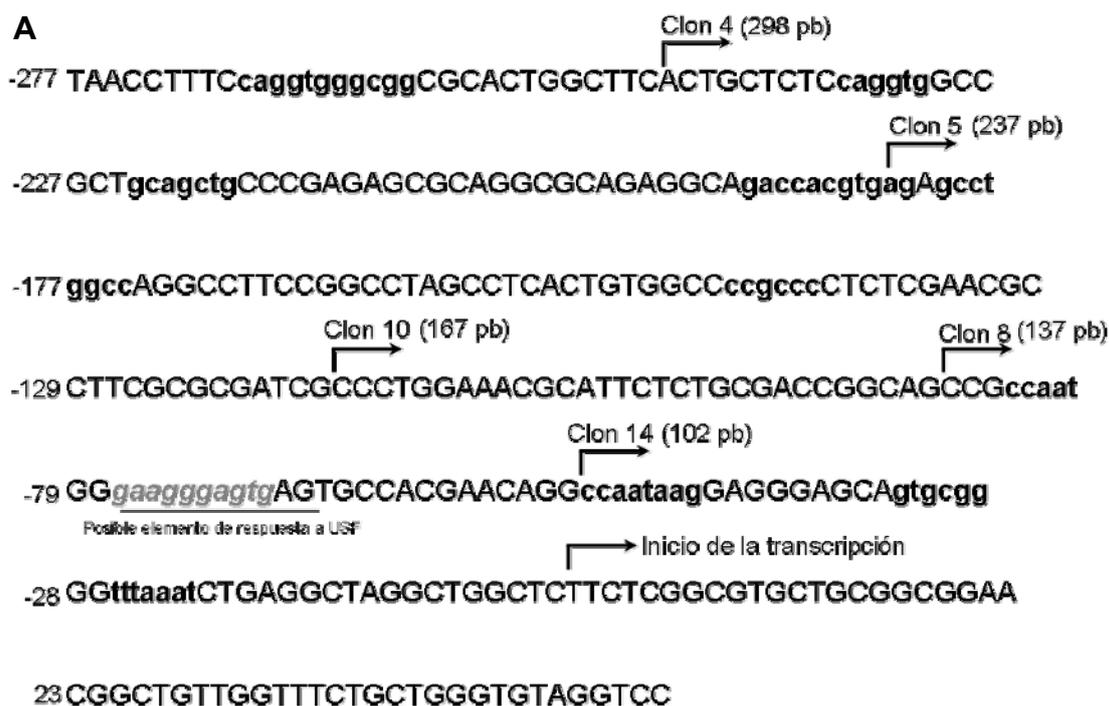


Fig 42. Efecto del SKF 104976 sobre la actividad del promotor de la ciclina B1. A. Parte de la secuencia del pCycB1 donde se indica la secuencia y longitud de los clones utilizados en el estudio. Las regiones que aparecen en minúscula se corresponden con elementos de respuesta. En negrita se muestran los elementos descritos y en cursiva y en gris, el posible elemento de respuesta a USF. B. En la gráfica se indica la actividad luciferasa/renilla como medida indirecta de la actividad del promotor de la ciclina B1 (pCycB1) en células MOLT-4 transfectadas con clones de distinta longitud del pCycB1 e incubadas durante 24 h en medio con LPDS solo (células control), con LDL 60 μ g/ml, o con SKF 104976 3 μ M en ausencia o presencia de LDL. Los datos se expresan como media \pm EE de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las comparaciones estadísticas se establecen frente a las células control (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$) o frente a las células tratadas con SKF (+ $p < 0,05$, ++ $p < 0,005$, +++ $p < 0,0005$).

Figura 43. Secuencia del clon con el sitio de respuesta a USF mutado. A. Se indica el alineamiento obtenido con el programa BLAST entre el promotor de la ciclina B1 (secuencia superior) y la secuencia del clon con el elemento de unión a USF mutado (secuencia inferior). B. En la gráfica se indica la actividad luciferasa/renilla como medida indirecta de la actividad del promotor de la ciclina B1 (pCycB1) en células MOLT-4 transfectadas con el clon 5 del pCycB1 con el ERU mutado o intacto e incubadas durante 24 h en medio con LPDS solo (células control), con LDL 60 µg/ml, o con SKF 104976 3 µM en ausencia o presencia de LDL. Los datos se expresan como media ± DE de 4 experimentos independientes realizados por duplicado. Las comparaciones estadísticas se establecen frente a las células control (** $p < 0,005$)

Discusión

Discusión

El colesterol es una molécula de vital importancia en muchos procesos celulares. Generalmente esta importancia se le ha atribuido por su papel como componente estructural de membranas o por ser el precursor de las hormonas esteroídicas y de los ácidos biliares. En la ruta de síntesis del colesterol se generan, además, compuestos intermediarios (esteroles o no) de los que derivan moléculas insustituibles para el buen funcionamiento de la célula. Este es el caso de los isoprenoides no esteroídicos, producidos en las etapas previas a la generación del escualeno, que son precursores de moléculas implicadas en muchos y muy distintos procesos celulares como la transcripción (isopentenil tRNAs), la N-glicosilación (dolicol) y prenilación (farnesil y geranylgeraniol) de proteínas, y el transporte electrónico mitocondrial (ubiquinona) (Clayton, 1998; Ikonen, 2006) (Fig 1A). Cabe destacar también, la importancia del 7-DHC como precursor de la vitamina D (Fig 1B) (Herman, 2003).

El colesterol también actúa como regulador de procesos celulares y de la actividad de determinadas proteínas. Tal es el caso de las proteínas SREBP, implicadas en la homeostasis del colesterol y la adipogénesis (Brown and Goldstein, 1999), cuyo procesamiento se inhibe en presencia de colesterol en el RE, o el de las proteínas Sonic Hedgehog (Shh) de vertebrados, que dirigen el desarrollo animal, las cuales deben formar aductos con el colesterol para desempeñar correctamente su función biológica (Peters et al., 2004). La importancia de esta acción se manifiesta al comprobar la gravedad de la sintomatología de enfermedades debidas a deficiencias de enzimas implicadas en la biosíntesis del colesterol.

El colesterol es imprescindible para la proliferación celular y ejerce acciones específicas, alguna de carácter regulador, en el ciclo celular. Nuestro grupo, concretamente, ha demostrado que la inhibición de la colesterogénesis afecta la progresión del ciclo celular, acumulándose las células en G2/M e impidiéndose finalmente la citocinesis (Fernandez et al., 2005; Fernandez et al., 2002; Martinez-Botas et al., 2001; Martinez-Botas et al., 1999; Suarez et al., 2002; Suarez et al., 2005).

En cuanto a su papel en la membrana celular, el colesterol se ha venido considerando como un mero componente estructural encargado de empaquetar los fosfolípidos y aportar rigidez a las bicapas. Pero lo cierto es que, además, es un componente estabilizador esencial de los dominios denominados "lipid rafts", regiones de la membrana donde se inician multitud de procesos de señalización celular (Pike, 2003), como lo ponen en evidencia los estudios sobre las propiedades biofísicas de las membranas cuando el colesterol es sustituido por otros intermediarios de la colesterogénesis (Megha et al., 2006; Samuli Ollila et al., 2007; Vainio et al., 2006), los estudios con ratones KO (Keller et al., 2004; Kovarova et al., 2006), o los efectos de inhibidores de las enzimas de la síntesis de colesterol (Hillyard et al., 2004; Hillyard et al., 2007).

En el presente trabajo nos planteamos como objetivos estudiar los efectos de la inhibición de la biosíntesis de colesterol en la adipogénesis y su relación con el mantenimiento de la funcionalidad de los "lipid rafts" en este proceso así como en otros. También decidimos ahondar en el estudio de su papel regulador de la expresión génica en el ciclo celular.

1. Colesterol y adipogénesis

La obesidad es una enfermedad metabólica caracterizada por un aumento en la cantidad de tejido adiposo debido al incremento tanto en el tamaño (hipertrofia) como en el número de adipocitos (hiperplasia) (Couillard et al., 2000). Este aumento en el número de adipocitos es resultado directo de una mayor tasa de adipogénesis, por la que se generan

nuevas células grasas a partir de los preadipocitos presentes en el tejido adiposo de individuos adultos (Hauner et al., 1989).

El colesterol es importante para la fisiología del adipocito. Durante la adipogénesis tiene lugar una redistribución del colesterol de la membrana a las gotas lipídicas, mientras que los adipocitos hipertróficos muestran una disminución en los niveles de colesterol en sus membranas en comparación con los adipocitos normales (Le Lay et al., 2001). En este sentido, en adipocitos maduros normales, la extracción del colesterol de membrana con β MCD induce resistencia a la insulina (Le Lay et al., 2001). En esta línea, parece lógico pensar que el colesterol, lejos de ser considerado simplemente como un componente estructural de la membrana plasmática, participa en la regulación de la fisiología del adipocito. Por otro lado, existen datos en la literatura que sugieren una correlación entre los niveles de colesterol celular y la capacidad de los preadipocitos en diferenciación de almacenar triglicéridos en sus gotas lipídicas (Dugail et al., 2003; Pohl et al., 2004). Este paralelismo entre el contenido de colesterol y el tamaño celular viene apoyado por el hecho, observado hace más de 20 años, de que al reducir el contenido de triglicéridos, se reducía el tamaño celular y el contenido de colesterol en los adipocitos (Krause and Hartman, 1984). Observación que coincide con estudios más recientes en los que el desplazamiento del colesterol de la membrana a las gotas lipídicas estaría contribuyendo al aumento de la gota lipídica y, por tanto, al aumento del tamaño celular (Le Lay et al., 2001).

Nosotros decidimos estudiar los efectos de la inhibición de la biosíntesis de colesterol sobre la adipogénesis, eligiendo como modelo las células 3T3-L1 que se diferencian a adipocitos tras su estimulación con insulina, dexametasona e IBMX. Para este estudio empleamos inhibidores de distintas enzimas de la colesterogénesis cuya acción había sido descrita en distintos tipos celulares (Fernández Hernando, 2003). Sin embargo, quisimos comprobar su acción en las células 3T3-L1 antes de emprender el estudio de sus efectos sobre la diferenciación. Como cabría esperar, el SKF 104976 bloqueó la lanosterol 14 α -desmetilasa provocando la acumulación de lanosterol y dihidrolanosterol (Fig 12A); el AY 9944, la Δ^7 -reductasa como lo indica la acumulación de 7-DHD y 7-DHC (Fig 12A); el 5,22-colestadien-3 β -ol provocó la acumulación de desmosterol y 7-DHD (Fig 12A), mostrando la inhibición de la Δ^{24} -reductasa, acción descrita por vez primera en nuestro laboratorio (Fernandez et al., 2002). Sobre el triparanol, encontramos que a la concentración de 3 μ M provocaba la acumulación de 7-DHC y zimosterol, revelada por el análisis por GC/MS en las células 3T3-L1 (Fig 12B), lo que indica que el triparanol estaba inhibiendo la Δ^7 -reductasa y la $\Delta^{8,7}$ -isomerasa, además de la Δ^{24} -reductasa inicialmente descrita (Avigan et al., 1960).

La inhibición de la biosíntesis de colesterol, en células incubadas en un medio libre del mismo, afectó fuertemente la diferenciación, observándose una clara disminución de la formación de gotas lipídicas en las células 3T3-L1 a los 5 días después de inducir su diferenciación (Fig 13A). Esto fue corroborado por el descenso en el contenido de triglicéridos (Tabla 4). La adición de colesterol al medio, evitó los efectos del SKF 104976, lo que indicaba que la disponibilidad de colesterol afecta la capacidad de las células 3T3-L1 de transformarse en adipocitos maduros y acumular gotas lipídicas. Esto concuerda con observaciones previas de otros grupos que mostraban que la sobrecarga de colesterol a las células provocaba una mayor captación de ácidos grasos, mientras que la privación de colesterol conducía al efecto contrario (Pohl et al., 2004). En conjunto, los resultados apoyan la hipótesis de que la disponibilidad de colesterol incide sobre la acumulación lipídica en el adipocito (Dugail et al., 2003; Le Lay et al., 2001).

Durante la adipogénesis, después de experimentar una parada del crecimiento al llegar al estado de quiescencia, y ante un estímulo hormonal adecuado, las células 3T3-L1 sufren varias rondas de división. Este momento de la diferenciación se denomina fase de expansión clonal y precede la expresión de factores de transcripción que disparan el programa

adipogénico (MacDougald and Lane, 1995). Para algunos autores, la fase de expansión clonal es determinante para que se desarrolle la adipogénesis, puesto que es lógico pensar que durante esta etapa el DNA sea más accesible a la unión de factores de transcripción. De hecho, en células 3T3-L1, se ha observado que la inhibición de la proliferación durante la diferenciación impide su transformación a adipocitos maduros, habiéndose propuesto que la fase de expansión clonal es indispensable para que culmine la adipogénesis en este tipo celular (Yeh et al., 1995a). Teniendo en cuenta las observaciones previas de nuestro grupo en las que el bloqueo de la síntesis de colesterol por parte de inhibidores distales, acarrea una parada del ciclo celular en G2/M (Fernandez et al., 2005; Suarez et al., 2005), pensamos que la inhibición de la colesterogénesis en los preadipocitos 3T3-L1 en diferenciación podría bloquear la fase de expansión clonal y, en consecuencia, su capacidad de diferenciación. Los resultados, sin embargo, mostraron que ése no era el caso. A las 20 horas tras la inducción de la diferenciación en las células 3T3-L1 (momento en que observamos síntesis de DNA después de inducir el proceso) (Fig 17), el tratamiento con distintos inhibidores no provocó, en ningún caso, disminuciones destacables en la síntesis de DNA (Fig 18). Además, el ciclo celular progresó normalmente en presencia de AY 9944, y sorprendentemente, observamos que tanto las células tratadas como las controles sólo realizaban un ciclo de división durante la expansión clonal (Fig 19). Esto contrasta con la opinión más generalizada de que estas células experimentan al menos dos ciclos de división (Tang and Lane, 1999) pero coincide con las observaciones de Aouadi y colaboradores que indican que los preadipocitos humanos sólo experimentan una o ninguna ronda de división y aún así, son capaces de diferenciarse a adipocitos (Aouadi et al., 2007). Independientemente de ello, nuestros resultados muestran que a pesar de la completa inhibición de la síntesis de colesterol, las células consiguen completar un ciclo de división. La interpretación no puede ser otra más que estas células contienen de partida suficiente colesterol como para mantener una ronda de división. De hecho, en nuestro laboratorio se había demostrado en células HL-60 (que normalmente presentan un bajo contenido de colesterol) expuestas a los inhibiciones de la biosíntesis de colesterol consiguen dividirse una vez, lo cual se traduce en que el contenido de colesterol disminuya a la mitad aproximadamente, y es a partir de este momento cuando las células son incapaces de dividirse de nuevo (Fernandez et al., 2005). Por lo tanto, el contenido de colesterol en las células 3T3-L1 parece ser suficiente como para permitir que se desarrolle la fase de expansión clonal. No obstante, ese colesterol sería insuficiente para mantener los procesos celulares que conducen a la adipogénesis, como se comenta a continuación.

Otros autores han estudiado el efecto de las estatinas sobre la adipogénesis. Estos trabajos demuestran que las estatinas inhiben la diferenciación de fibroblastos a adipocitos (Nishio et al., 1996; Tomiyama et al., 1999) y que bloquean la expresión de PPAR γ (Li et al., 2003; Nakata et al., 2006; Nicholson et al., 2007) y reducen la de C/EBP α (Nakata et al., 2006). Las dosis de estatinas empleadas han sido tales que no permiten descartar que su único efecto fuera inhibir la síntesis de colesterol. Al contrario, dado que actúan inhibiendo la HMG-CoA reductasa, es probable que además inhibieran sustancialmente la formación de isoprenoides no esteroídicos necesarios para la prenilación de proteínas, comprometiendo la función de las proteínas preniladas. En nuestro abordaje experimental hemos obviado dicho problema, puesto que los inhibidores utilizados bloquean la biosíntesis de colesterol en pasos posteriores a la producción de lanosterol, permitiendo la disponibilidad de isoprenoides no esteroídicos (Fig 1B). Nuestros resultados coinciden, no obstante, en confirmar que la inhibición de la biosíntesis de colesterol conduce a un descenso en la expresión de PPAR γ y C/EBP α por efecto de la falta de colesterol (Fig 15A y E). Otro de los factores cuya expresión analizamos fue el LXR α ; el papel de este factor activado por oxisteroles en la adipogénesis fue propuesto por Seo y colaboradores (Seo et al., 2004). Nosotros encontramos que igual que PPAR γ y C/EBP α , su expresión disminuye con el uso de los inhibidores (Fig 15B y E). También comprobamos que

una estatina, la atorvastatina, provocó los mismos efectos sobre la expresión de mRNA de PPAR γ (Fig 15C) y de LXRA (Fig 15D) que otros inhibidores más distales de la ruta (Fig 15A y B). En todos los casos, el efecto de los inhibidores sobre la expresión de estos factores de transcripción se evitó al añadir colesterol al medio de incubación, tanto libre como en forma de LDL. La disminución en los niveles de colesterol sería, por tanto, el mecanismo desencadenante de los cambios moleculares a nivel de expresión de mensajero y proteína de los factores de transcripción mostrados.

Estos efectos, cabe la posibilidad de que estén mediados por una alteración en las vías de señalización. Parece ser que son las vías de las MAPKs ERK y p38 y la vía de PKB/Akt las más implicadas en la adipogénesis (Aouadi et al., 2006a; Baudry et al., 2006; Bost et al., 2005a; Gagnon et al., 1999; Magun et al., 1996), aunque hay datos discordantes. Esta controversia se debe principalmente a que estas quinasas deben activarse y desactivarse en distintos momentos del proceso (Bost et al., 2005a). Inhibidores de p38 bloquean completamente la diferenciación de células 3T3-L1 a adipocitos si se administran durante los primeros estadios de la diferenciación (Engelman et al., 1998); sin embargo si p38 se mantiene activa de manera prolongada durante el proceso provoca la muerte celular de los adipocitos en diferenciación (Engelman et al., 1999). Por otro lado, el uso de oligonucleótidos antisentido contra ERK1/2 bloquea la diferenciación de las células 3T3-L1 estimuladas con insulina (Sale et al., 1995), mientras que otros estudios señalan que ERK1/2 puede inhibir la adipogénesis mediante la fosforilación de PPAR γ , que inhibe su actividad (Camp and Tafuri, 1997; Hu et al., 1996). Por eso en las primeras etapas de la diferenciación, en las que se le ha atribuido un papel en la expansión clonal, se hace necesaria la activación de ERK1/2, en tanto que debe desactivarse más adelante para mantener activo PPAR γ . La vía de PI3K/Akt estimulada por la insulina tiene una gran implicación en la adipogénesis. De hecho, la expresión de una forma constitutivamente activa de Akt provoca la diferenciación espontánea de las células 3T3-L1 a adipocitos (Magun et al., 1996). Por otra parte, un descenso de su actividad inhibe la expresión de PPAR γ (Baudry et al., 2006; Peng et al., 2003). Sin embargo, un estudio reciente consigue la estimulación de la adipogénesis reprimiendo Akt (Kim et al., 2007). Nuestros datos a este respecto señalan que la inhibición de la colesterogénesis con SKF 104976 o con AY 9944, provoca un fuerte descenso en la fosforilación de ERK1/2, p38 MAPK y de Akt (Fig 20C y 22). La adición de colesterol al medio evitó el descenso del estado de fosforilación de estas quinasas así como la inhibición de la adipogénesis, lo que sugiere que estas vías de señalización están mediando los efectos del colesterol sobre este proceso de diferenciación.

Respecto a la implicación de la JNK MAPK, nosotros no detectamos su fosforilación tras inducir la diferenciación de las células 3T3-L1 en condiciones controles (Fig 21), lo que en principio permite descartar su participación en este proceso. Este resultado es compatible con las observaciones de otros autores que indican que la activación de JNK se relaciona negativamente con la inducción de la adipogénesis, de hecho, su activación conduce a la fosforilación de PPAR γ , inactivándola, y disminuye la expresión de aP2 (Bost et al., 2005a; Camp et al., 1999; Hong et al., 2007).

Una de las funciones atribuidas tanto a la vía de ERK1/2 como a la de p38 MAPK es la fosforilación del factor de transcripción C/EBP β (Engelman et al., 1998; Piwien-Pilipuk et al., 2001; Tang et al., 2005). Esta proteína es el primer factor de transcripción que se activa en la adipogénesis. Durante el primer día de diferenciación nosotros no encontramos alteraciones en su expresión ante la inhibición de la colesterogénesis (Fig 14); sin embargo, se conoce que para ser funcional, C/EBP β necesita sufrir modificaciones postranscripcionales que consisten en una serie de fosforilaciones sucesivas (Tang et al., 2005). La primera de estas fosforilaciones ocurre en el residuo Thr188 y es necesaria, aunque no suficiente, para que C/EBP β adquiera la capacidad de unirse al DNA en regiones promotoras y activar la transcripción de sus genes diana (Tang et al., 2005). Puesto que la inhibición de la

colesterogénesis afecta vías de señalización capaces de fosforilar a C/EBP β , estudiamos esta fosforilación en presencia de distintos inhibidores de la colesterogénesis. Observamos que, efectivamente, la inhibición de la colesterogénesis reducía extraordinariamente la fosforilación de C/EBP β en Thr188 (Fig 23B). A continuación determinamos la vía responsable de la inhibición de tal fosforilación, que resultó ser la vía de ERK1/2. Este hecho viene apoyado por datos bibliográficos que señalan que, aunque p38 también es capaz de fosforilar C/EBP β en determinadas circunstancias (Engelman et al., 1999; Engelman et al., 1998), la quinasa responsable de la fosforilación de este factor es ERK1/2 (Bost et al., 2005b; Prusty et al., 2002; Tang et al., 2005; Tang et al., 2003). C/EBP β , una vez fosforilado, activa la expresión tanto de PPAR γ como de C/EBP α (Farmer, 2006; Zuo et al., 2006). Por lo tanto, considerando todos estos resultados, proponemos que el bloqueo de la adipogénesis por efecto de la inhibición de la síntesis de colesterol está mediado por la inhibición de la fosforilación de C/EBP β vía ERK1/2, que, a su vez, conduciría a un descenso en la expresión de PPAR γ y C/EBP α y, en definitiva, a una alteración en la adipogénesis.

Se sabe que PPAR γ y C/EBP α activan su expresión mutuamente (Shao and Lazar, 1997), hecho que contribuye al mantenimiento de sus niveles. En cuanto a LXR α , el grupo de Peter Tontonoz considera que este factor no está implicado en el control de la adipogénesis aunque sí en la regulación de ciertos genes en los adipocitos (Hummasi et al., 2004). De cualquier manera, PPAR γ y LXR α también activan mutuamente su expresión (Seo et al., 2004). Además, LXR tiene como agonistas a los oxisteroles, que derivan del metabolismo del colesterol (Janowski et al., 1996; Schultz et al., 2000). Por tanto, el descenso en la expresión de LXR α por efecto de la inhibición de la biosíntesis de colesterol podría ser el resultado tanto del descenso en la expresión de PPAR γ como, posiblemente también, por una menor presencia de sus ligandos naturales, los oxisteroles.

En situaciones normales, a lo largo de la diferenciación se establece una red de interacciones entre estos tres factores y el SREBP-1c (Fig 7) que conduce al aumento de la lipogénesis y a la expresión de proteínas específicas de adipocitos como la adiposina o la aP2. La expresión de estas dos últimas proteínas también se encontró notablemente disminuida en las células sometidas a diferenciación en presencia de inhibidores de la biosíntesis de colesterol (Fig 16). Como en el caso de los factores de transcripción, la adición de colesterol al medio junto con los distintos inhibidores, evitó los efectos de estos últimos. Esto apoya, una vez más, que es imprescindible que las células 3T3-L1 dispongan de suficiente colesterol para poder alcanzar el estadio de adipocitos tras someterse a un estímulo de diferenciación.

Cabe aclarar que en algunos de los procesos estudiados hasta el momento, como la acumulación de gotas lipídicas o la expresión de determinados factores de transcripción, el LPDS no es capaz de reproducir los resultados obtenidos al diferenciar las células en presencia de FBS. Además, el aporte de colesterol al medio tampoco permite que las células diferenciadas en LPDS alcancen los niveles de expresión y acumulaciones lipídicas que se logran si se diferencian con FBS. Una explicación plausible es que para el correcto desarrollo del proceso sea necesario, aparte del colesterol, un componente del suero que está ausente o inactivo en el LPDS.

En definitiva, todos estos resultados indican que el descenso en la disponibilidad de colesterol conduce a la inhibición de la adipogénesis probablemente por inhibición de la vía de ERK1/2 y, en consecuencia, de la fosforilación de C/EBP β , hecho que incapacita a este factor para unirse al DNA y activar la expresión de sus genes diana, entre los que se encuentran factores de transcripción como PPAR γ y C/EBP α , claves para el control del proceso.

2. Implicación de los “lipid rafts” en el proceso de adipogénesis

Los “lipid rafts” son microdominios de membrana ricos en colesterol y esfingolípidos donde se concentran gran cantidad de proteínas implicadas en procesos de señalización celular. En las células 3T3-L1 la reducción de los niveles de colesterol en estos microdominios por el uso de β MCD, desestructura los “lipid rafts” e impide la diferenciación de estas células a adipocitos, alterando la señalización mediada por la insulina y la actividad de ERK1/2 y Akt (Hong et al., 2004; Huo et al., 2003). En el mismo sentido, la depleción de colesterol por el uso de CDs provoca una disminución en la expresión del transportador de glucosa GLUT4 en las membranas de adipocitos 3T3-L1 haciéndoles resistentes a la insulina, que se ha atribuido a la alteración de las caveolas (Le Lay et al., 2001).

En nuestro abordaje experimental, para reducir el contenido celular de colesterol empleamos inhibidores de la colesterogénesis, no CDs, por su mayor proximidad a un hipotético uso terapéutico. En este caso, al tiempo que se reduce el contenido de colesterol en la membrana, se incrementa la presencia de otros esteroides, intermediarios de la colesterogénesis, dependiendo de las enzimas que hayan resultado inhibidas (Tabla 5). Estos cambios en la composición de esteroides pueden afectar las propiedades biofísicas y biológicas de las membranas y de los “lipid rafts” concretamente.

Existen multitud de estudios realizados en membranas artificiales, en los que se establece la repercusión de estos esteroides intermediarios en las propiedades de las bicapas. Los intermediarios en la síntesis de colesterol que contienen un doble enlace en el carbono 8 (lanosterol, dihidrolanosterol, zimosterol y zimostenol) (Fig 1B) estabilizan débilmente las estructuras equivalentes a los “lipid rafts” (Megha et al., 2006; Miao et al., 2002). Podría pensarse que esteroides con estructura más parecida al colesterol, generados en etapas más avanzadas de la colesterogénesis, podrían sustituirle en la formación de estos microdominios. Lo cierto es que compuestos de este tipo, como el latosterol y el 7-DHC se incorporan a la membrana de manera más eficaz que el propio colesterol pero alteran una característica importante, como es la presión lateral (Samuli Ollila et al., 2007). Esta propiedad de las membranas es determinante para que las proteínas experimenten los cambios conformacionales precisos para su activación (Samuli Ollila et al., 2007).

La observación de que el 7-DHC es más eficiente que el colesterol a la hora de formar estos dominios (Megha et al., 2006), concuerda con nuestros resultados, donde la incorporación de 7-DHC a zonas de “lipid rafts” fue muy superior (27 veces) que a las zonas no-“raft” (Tabla 5). Estas diferencias en la concentración entre las distintas regiones de membrana son mucho más marcadas en el caso del 7-DHC que en el de otros esteroides, entre ellos el propio colesterol (Tabla 5). A pesar de ello, Keller y colaboradores demostraron que la sustitución del colesterol por 7-DHC en “lipid rafts” de células de rata tratadas con AY 9944, alteraba propiedades biofísicas de la membrana, como el perfil de presión lateral, y la composición proteica de estos microdominios (Keller et al., 2004).

Otros autores han hecho uso también de inhibidores de la biosíntesis de colesterol para desentrañar el papel del colesterol en la funcionalidad de los “lipid rafts”. Ya hemos comentado las dificultades que presentan las estatinas a la hora de la interpretación de los resultados obtenidos con su uso, por su doble acción inhibiendo la síntesis de colesterol y también la de isoprenoides necesarios para la prenilación de proteínas. Aún así, las estatinas se ha demostrado que alteran la composición de los “lipid rafts”, desestructurándolos, y alterando su funcionalidad, concretamente, la actividad de proteínas implicadas en la señalización por insulina (Hillyard et al., 2004; Hillyard et al., 2007; Zhuang et al., 2005). Otros autores han observado en células neuronales que el tratamiento con AY 9944 provoca la deslocalización de receptores NMDA de los “lipid rafts”, disminuyendo su respuesta al glutamato (Ponce et al., 2008). El ácido zaragóxico A, que inhibe la escualeno sintasa, se ha demostrado que también

reduce el contenido de colesterol en los "lipid rafts" (Brusselmans et al., 2007). Estos resultados, junto con los nuestros, muestran que la inhibición de la biosíntesis de colesterol puede llevar a una alteración de la composición de los "lipid rafts" y, con ello, de su funcionalidad.

Dada la relevancia del receptor de la insulina en la fisiología, nos planteamos analizar en qué medida la inhibición de la biosíntesis de colesterol con inhibidores distales de la ruta podía afectar su funcionalidad. En primer lugar, confirmamos la presencia de dicho receptor en las fracciones correspondientes a "lipid rafts" en las membranas de los preadipocitos 3T3-L1 (Fig 29), en coherencia con los resultados de otros autores (Gustavsson et al., 1999). Además, demostramos la presencia en dichos dominios de la proteína acopladora Fyn, implicada en la transmisión de la señal (Fig 29). Fue interesante también, observar que ambas proteínas se presentan juntas en microdominios concretos de la membrana (Fig 33), lo que refuerza el concepto del papel de los "lipid rafts" como integradores de la señalización al compartimentalizar los elementos de las rutas de señalización. Se deduce, pues, la posibilidad de que una disminución en los niveles de colesterol en la membrana afecte la estructura de los "lipid rafts" y, en consecuencia, la funcionalidad del receptor de insulina situado en estas regiones, así como la señalización mediada por él. En esta línea de pensamiento, nuestro trabajo aporta nuevos datos, como es el hecho de que la sustitución del colesterol por otros intermediarios, provocada por el uso de distintos inhibidores de la colesterogénesis, va unida a una pérdida de funcionalidad en la vía de señalización de la insulina, evidenciada por una menor fosforilación en tirosina de su receptor (Fig 30), una deslocalización de Fyn de los "lipid rafts" (Fig 30), así como una disminución en la actividad de Akt (Fig 31). Además, hemos demostrado que estas alteraciones en la señalización se traducen en cambios metabólicos, como es la menor capacidad para responder a la insulina y captar glucosa del medio, mostrada por las células 3T3-L1 tratadas con inhibidores de la biosíntesis de colesterol (Fig 32). Estos últimos resultados concuerdan con datos del grupo de Stralfors, que indican que la extracción del colesterol de la membrana con el uso de CDs bloquea la estimulación de la captación de glucosa por parte de la insulina, haciendo a los adipocitos 3T3-L1 resistentes a dicha hormona (Gustavsson et al., 1999; Karlsson et al., 2004; Parpal et al., 2001). Por otra parte, en adipocitos normales, la extracción del colesterol celular con CDs conduce a una menor expresión de GLUT-4 en las membranas y a un estado de insulinoresistencia (Le Lay et al., 2001). A todo esto hay que unir la observación de la disminución de los niveles de colesterol en las membranas de adipocitos procedentes de ratones obesos, que vendría a apoyar la hipótesis de la desestructuración de los "lipid rafts" en los adipocitos en la obesidad (Le Lay et al., 2001). En suma, nuestros resultados, junto con los de otros autores, permiten contemplar que la insulinoresistencia en la obesidad, entre otras causas puede tener su origen en una disminución en el contenido de colesterol en los "lipid rafts" de la membrana de los adipocitos, provocado por un aumento en el tránsito de colesterol de la membrana a la gota lipídica.

Estos resultados llevan a preguntarse sobre la sensibilidad a la insulina en los síndromes causados por las deficiencias congénitas de la biosíntesis de colesterol. Desgraciadamente, se carecen de datos al respecto. Las graves alteraciones a nivel del desarrollo y del comportamiento que se presentan en estos síndromes probablemente han enmascarado otras alteraciones metabólicas. Se dispone de ratones KO para algunas de las enzimas de la biosíntesis de colesterol que permitirían realizar estos estudios pero, hasta donde hemos podido alcanzar, no se han publicado datos a este respecto todavía. Una circunstancia que debe tenerse en cuenta es que dichos animales son alimentados con dietas que contienen colesterol, por lo que los posibles efectos de la deficiencia de colesterol se verían anulados. Estos modelos se han utilizado, no obstante, para estudiar la funcionalidad de los "lipid rafts". Así, en células de ratones KO para la Δ^7 -reductasa se ha observado una

desestabilización de los “lipid rafts” por acumulación de 7-DHC (Kovarova et al., 2006), lo que concuerda con nuestros resultados obtenidos en células tratadas con AY 9944.

En conclusión, nuestro estudio evidencia la superioridad del colesterol con respecto a los intermediarios de su biosíntesis, para estabilizar la estructura y mantener la funcionalidad de los “lipid rafts”. Los esteroides precursores del colesterol no son capaces de conservar la cascada de señalización de la insulina en los preadipocitos, afectando en último término a la señalización que dirige la adipogénesis.

Un comentario especial merece el desmosterol, el inmediato precursor del colesterol a través de la vía de Bloch. Este esteroide posee un doble enlace adicional en el carbono 24 de la cadena lateral con respecto al colesterol. A pesar de esta elevada similitud estructural, en estudios biofísicos se observa que el desmosterol estabiliza más débilmente las membranas que el colesterol (Rog et al., 2008; Vainio et al., 2006); y en células suplementadas con desmosterol, aunque se detecta en los “lipid rafts”, su incorporación a los mismos es tres veces menor que la de colesterol (Vainio et al., 2006). Todo ello ha llevado a proponer que el colesterol es superior al desmosterol en cuanto a la promoción de orden en las bicapas lipídicas (Vainio et al., 2006). Aun con todo, el desmosterol puede sustituir al colesterol en las propiedades básicas de las membranas, siempre y cuando se produzcan ciertos reajustes en el tipo de ácidos grasos de los fosfolípidos (Megha et al., 2006; Rog et al., 2008). En determinados tipos celulares, como espermatozoides (Lin et al., 1993) y astrocitos (Mutka et al., 2004), el desmosterol es un componente muy abundante en sus membranas. Es más, ciertos tipos celulares con deficiencia en la esteroide Δ^{24} -reductasa, que sintetizan desmosterol en vez de colesterol, pueden sobrevivir sin aporte exógeno de colesterol (Rodríguez-Acebes S, 2009; Rothblat et al., 1970). Por último, se han creado ratones KO para la Δ^{24} -reductasa, lo que en principio indicaría que este esteroide puede sustituir al colesterol en todas sus funciones (Wechsler et al., 2003), aunque existen ciertas dudas a este respecto, por cuanto las dietas con que se alimentan estos animales parecen contener cierta cantidad de colesterol. Aun con todo, estos animales son estériles, lo que ya indica que al menos en el aparato reproductor el colesterol es insustituible.

Estos resultados contrastan con los relativos a la composición de los “lipid rafts” y su funcionalidad en células donde se sustituye el colesterol por desmosterol. Como hemos mostrado en Resultados, el tratamiento de las células 3T3-L1 con inhibidores de la Δ^{24} -reductasa, como el triparanol y el 5,22-colestadien-3 β -ol, alteró la composición de los “lipid rafts”, con un descenso del contenido de colesterol en las membranas y el aumento del desmosterol (Tabla 5). Esto produjo la desestructuración de los “lipid rafts” en tanto y en cuanto se deslocalizaron componentes característicos de dichos dominios, como la caveolina y el GM1 (Fig 27 y 28); y finalmente, disminuyó la respuesta a la insulina (Fig 30 y 31). Por tanto, la inhibición de la Δ^{24} -reductasa conlleva una alteración de la funcionalidad del RI. Por su parte, el grupo de Elina Ikonen encontró que la sustitución del colesterol por desmosterol provocaba un descenso en la localización de la caveolina-1 y alteraba la morfología de las caveolas (Jansen et al., 2008; Vainio et al., 2006). Esto venía acompañado de una menor localización del RI en los “lipid rafts” y alteración de su activación (Vainio et al., 2006). En MEFs de ratones KO para la Δ^{24} -reductasa, se ha observado que el contenido de caveolina-1 en los “lipid rafts” está disminuido, así como la presencia del RI, estando ambas proteínas deslocalizadas; todo lo cual indica la desestructuración de estos microdominios como resultado de la incapacidad de estas células para sintetizar colesterol y de la acumulación de desmosterol que se produce en sus membranas (Lu et al., 2006). Estos cambios se acompañan de un descenso en la capacidad de la insulina para fosforilar IRS-1 y Akt (Lu et al., 2006).

En conjunto, estos resultados indican que el desmosterol puede sustituir al colesterol en funciones tales como la proliferación celular y la integridad de las membranas pero ciertas

funciones relacionadas con la señalización pueden verse alteradas como resultado del cambio de las proporciones de colesterol y desmosterol en los “lipid rafts”.

3. Efectos del haloperidol sobre la estructura y funcionalidad de los “lipid rafts”

El haloperidol es una butirofenona ampliamente utilizada en el tratamiento de comportamientos psicóticos agudos o crónicos, que ejerce su efecto terapéutico principalmente a través de la inhibición de los receptores cerebrales de dopamina D2. Como otros antipsicóticos, el haloperidol también provoca efectos secundarios extrapiramidales, así como alteraciones metabólicas, como aumento de peso, desregulación de la glucemia, resistencia a la insulina y empeoramiento del perfil lipídico (Allison et al., 1999; Kato and Goodnick, 2001; Meyer and Koro, 2004; Perez-Iglesias et al., 2007). El interés por el estudio de los efectos metabólicos del haloperidol se fundamenta en resultados previos de otros autores que apuntaban a que este compuesto era capaz de inhibir la biosíntesis de colesterol. Ya en 1965, Summerly y Yardley describieron la disminución de la síntesis de colesterol a partir de acetato radioactivo en la piel de ratas tratadas con haloperidol (Summerly, 1965). Esto concuerda con la activación del procesamiento de SREBP-2 y la consiguiente estimulación de la expresión de genes de la síntesis de colesterol que se han observado recientemente en células de tipo neuronal tratadas con haloperidol (Ferno et al., 2005; Ferno et al., 2006; Raeder et al., 2006).

En el transcurso de nuestros estudios, primeramente nos centramos en sus efectos sobre la biosíntesis de colesterol, donde comprobamos que efectivamente, el haloperidol bloquea la síntesis de colesterol como resultado de la inhibición de diferentes enzimas según la dosis. A 10 μ M, las células SH-SY5Y acumularon 8,14-colestadien-3 β -ol, zimosterol y 7-DHC (Fig 34), mientras que a dosis más elevadas (50 μ M), aumenta la acumulación de 8,14-colestadien-3 β -ol y disminuye la de 7-DHC (Fig 34). Esto se interpreta como resultado de la diferente sensibilidad de las distintas enzimas de la ruta, siendo las enzimas afectadas la Δ^7 -reductasa, la $\Delta^{8,7}$ -isomerasa y la Δ^{14} -reductasa en este orden. Este efecto diferencial del haloperidol sobre la actividad de distintas enzimas de la biosíntesis del colesterol se observa también con otras aminas lipofílicas (Tuck et al., 1991). Así, en nuestro laboratorio se demostró que el AY 9944 inhibe esas mismas enzimas y con el mismo gradiente de afinidad que el haloperidol (Fernandez et al., 2005). La causa de la relativa inespecificidad de estos inhibidores parece deberse a que mimetizan al intermediario carbocatiónico que se forma durante las reacciones de reducción e isomerización que catalizan dichas enzimas (Taton et al., 1989).

En *Saccharomyces cerevisiae*, otros autores observaron que el haloperidol provocaba la acumulación de 8,14-ergostadien-3 β -ol, lo que sugería la inhibición de la Δ^{14} -reductasa (Silve et al., 1996); hecho que coincide con nuestros resultados en células de mamíferos. En levaduras, el haloperidol tiene capacidad de unirse a la $\Delta^{8,7}$ -isomerasa de estos organismos (ERG2) y de inhibir su acción (Moebius et al., 1996). El caso es que dicha proteína ERG2 es estructuralmente distinta que la $\Delta^{8,7}$ -isomerasa de mamíferos (*Emopamil Binding Protein*; EBP) y, de hecho, no parece que el haloperidol se una a ésta con alta afinidad (Silve et al., 1996). En cualquier caso, nuestros resultados indican claramente una inhibición de la actividad de dicha enzima en células de mamífero, por lo que el mecanismo a través del cual el haloperidol ejerce esta acción se desconoce. Este antipsicótico también tiene afinidad por los receptores σ_1 (Moebius et al., 1997). Se sabe que ligandos de estos receptores también se unen a la Δ^7 -reductasa y, coincide con que diversas butirofenonas puedan inhibir la actividad de dicha enzima (Simpson et al., 1967). Además, los pacientes tratados con haloperidol muestran un incremento en la concentración de 7-DHC en el plasma (Kelley and Hennekam, 2000), lo que señala como causa la inhibición de la Δ^7 -reductasa. Por lo tanto, todo apunta a que el haloperidol es capaz de inhibir eficazmente la biosíntesis de colesterol a través de la inhibición de varias de sus enzimas. Es interesante mencionar que otros antipsicóticos típicos, como la

clozapina, estimulan, igual que el haloperidol, la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico (Ferno et al., 2006; Lange and Steck, 1994), lo cual sugiere que todos ellos pueden inhibir la biosíntesis de colesterol y, consecuentemente activar el procesamiento de los SREBPs.

Los “lipid rafts” se han identificado en todos los tipos celulares del SNC, tanto neuronas como células gliales, y se admite por diversos autores que estos microdominios de membrana son críticos para mantener un buen funcionamiento del cerebro, (Gielen et al., 2006; Suzuki et al., 2007; Tsui-Pierchala et al., 2002). En las células neuronales, sin embargo, no se detecta caveolina-1, en su lugar, los microdominios de membrana ricos en colesterol y esfingolípidos contienen flotilina (Bickel et al., 1997). Por eso hemos utilizado esta proteína como marcador de “lipid rafts” en las células SH-SY5Y (Fig 37B). El tratamiento de estas células con haloperidol provocó una alteración de la composición en esteroides de la membrana (Tabla 6), así como una deslocalización de la flotilina-1 de los “lipid rafts” (Fig 37B y C). Otros autores han encontrado también una reducción en el contenido de colesterol y en la expresión de flotilina en membranas de células neuronales de ratones tratados con estatinas (Kirsch et al., 2003). En estos mismos tipos celulares, la extracción del colesterol de la membrana mediante el uso de MCDs también produce la deslocalización de moléculas de señalización de los “lipid rafts”, afectando la funcionalidad de diversas rutas (Cabrera-Poch et al., 2004; Yu et al., 2004).

Estudios sobre las propiedades biofísicas de las membranas realizados por otros autores demuestran que el haloperidol reduce el grosor de las regiones ordenadas de la fase fluida en modelos de membranas artificiales, al parecer por desplazamiento del colesterol (Tessier et al., 2008). De hecho, tanto el haloperidol (Eisensamer et al., 2005) como sus metabolitos (Murata et al., 2007) se acumulan en las membranas celulares, lo cual se asocia a la pérdida de la integridad de las membranas en el cerebro de ratas tratadas con haloperidol (Murata et al., 2007). En humanos, la concentración de haloperidol en el SNC es entre 10 y 30 veces más elevada que en suero, variando su concentración entre 25-600 nM (Kornhuber et al., 1999) y un máximo de 10 µM (Korpi E.R., 1984). Además, el haloperidol se concentra preferentemente en los “lipid rafts”, unas 2-4 veces más que en otras regiones de la membrana celular (Eisensamer et al., 2005). Todo ello sugiere que, además de los efectos derivados de la inhibición de la biosíntesis del colesterol, el haloperidol puede afectar directamente la funcionalidad de los “lipid rafts” al intercalarse en los mismos en competición con el colesterol.

Las células gliales y las neuronas expresan receptores para la insulina (Havrankova et al., 1983). En cerebro, la señalización mediada por la insulina participa en procesos importantes como la plasticidad sináptica y la supervivencia neuronal (van der Heide et al., 2006). De hecho, esta señalización puede tener grandes implicaciones en la patogenia, patofisiología y tratamiento de desórdenes del desarrollo cerebral tales como la esquizofrenia (Girgis et al., 2008), enfermedad que se ha asociado con alteraciones en el metabolismo de la glucosa, como intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina (Girgis et al., 2008; Ryan et al., 2003). Por otro lado, se conoce que los pacientes medicados con haloperidol durante meses pueden llegar a desarrollar diabetes (Lin et al., 2006) o insulinoresistencia (Perez-Iglesias et al., 2007), estableciéndose una correlación positiva entre el aumento de peso que experimentan estos individuos con los cambios en los niveles de insulina, triglicéridos y el índice de resistencia a insulina. (Perez-Iglesias R, 2009). Finalmente, se ha constatado un descenso en la funcionalidad de la señalización mediada por el RI en el cortex prefrontal dorsolateral procedente de material postmortem de sujetos esquizofrénicos medicados con haloperidol en comparación con sujetos sanos (Zhao et al., 2006). En ratas, su administración no se ha detectado que provoque ningún efecto sobre el peso, el apetito, la adiposidad, el perfil lipídico, la glucemia o la tolerancia a la glucosa, pero sí produce un aumento en los niveles de insulina circulante indicativos de una resistencia a esta hormona (Lin et al., 2006).

Todos esos resultados motivaron nuestro interés por analizar los efectos del haloperidol sobre la funcionalidad del RI en células SH-SY5Y de neuroblastoma. En primer lugar detectamos la presencia del RI en los “lipid rafts” de dichas células (Fig 38). El tratamiento con haloperidol, además de alterar la composición en esteroides y la estructura de los “lipid rafts”, produjo una alteración de la vía de señalización de la insulina, como lo demuestran la disminución de la fosforilación del receptor (Fig 38), la deslocalización de Fyn de estos microdominios (Fig 39) y la disminución en la fosforilación y, por tanto, en la actividad de Akt (Fig 40). La causa de estos efectos probablemente es la desestructuración de los “lipid rafts”, por cuanto que el aporte de colesterol junto con el haloperidol evitó los efectos del fármaco. En cuanto a la participación de Akt en los efectos de este antipsicótico, otros autores observaron también que el haloperidol inhibía la actividad de Akt, en este caso en cultivos de células neuronales PC12 (Dai et al., 2007; Ukai et al., 2004). En este mismo sentido, se ha descrito una disminución en la funcionalidad de Akt en pacientes esquizofrénicos tratados con antipsicóticos típicos (Vestri et al., 2007; Zhao et al., 2006). En modelos animales, no obstante, el tratamiento crónico con haloperidol aumentó la fosforilación de Akt1, y en consecuencia, la de GSK3, mientras que el tratamiento agudo no provocó ningún efecto (Alimohamad et al., 2005; Emamian et al., 2004). Por lo tanto, se requieren más estudios *in vivo* para establecer el efecto del tratamiento con haloperidol sobre la vía insulina-Akt.

Un resultado llamativo de nuestro trabajo fue que la adición de LDL al medio de cultivo, como fuente de colesterol para las células, no conseguía evitar todos los efectos del haloperidol, a diferencia del colesterol libre. Esta incapacidad no se debe a la no internalización de estas lipoproteínas en el interior celular, como demostramos directamente siguiendo el trayecto de las LDL marcadas con Dil mediante estudios inmucitoquímicos (Fig 35). Estos ensayos, además, revelaron que las células tratadas con haloperidol acumulaban LDL en el compartimento endosómico-lisosomal terminal, y se retenía el colesterol libre procedente de las LDL en este emplazamiento celular. Además, el aumento de la concentración de las LDL en el medio, lejos de revertir el efecto del haloperidol, provocó mayores acumulaciones lisosomales (Fig 35). Por lo tanto, estos resultados demuestran por primera vez que el haloperidol interfiere en el tráfico intracelular del colesterol. Otras sustancias anfífilas de carácter catiónico, como el U18666A y el tamoxifeno, que también inhiben enzimas de la síntesis de colesterol, inhiben asimismo el tráfico endocítico del colesterol-LDL (Suarez et al., 2004). Este resultado puede tener especial relevancia pues puede significar que en condiciones fisiológicas, los efectos del haloperidol consecuencia de la inhibición de la biosíntesis de colesterol no serían anulados por las LDL circulantes en plasma.

En los “lipid rafts” se localizan gran cantidad de receptores acoplados a las proteínas G (Chini and Parenti, 2004). Entre ellos se encuentran los receptores de la somatostatina o SRIF (sst2) (Krisch et al., 1998). SRIF y el sst2, concretamente, son especialmente abundantes en el estriatum o cuerpo estriado de rata (Dournaud et al., 1996), donde se han asociado al control de la actividad motora (Rezek et al., 1977; Viollet et al., 2000). En ratas tratadas con haloperidol se ha observado un descenso en los niveles de SRIF en esta región cerebral, sugiriendo una implicación de la dopamina en la regulación de neuronas secretoras de somatostatina (Salin et al., 1990), puesto que el haloperidol ejerce sus funciones a través de receptores dopaminérgicos. En este sentido, Andreassen y colaboradores encontraron una correlación entre la diskinesia oral inducida por el haloperidol y la disminución en el número de neuronas somatostatinérgicas en el cuerpo estriado de ratas (Andreassen et al., 2000).

Con estos antecedentes y una vez observada la alteración de los “lipid rafts” en células SH-SY5Y tratadas con haloperidol, analizamos el efecto del haloperidol sobre la señalización mediada por SRIF. En estudios previos de otros autores se ha demostrado que el tratamiento crónico con haloperidol provoca un descenso en el número de receptores de SRIF en la corteza cerebral e hipocampo de ratas, sin afectar la capacidad de unión del ligando con el

receptor (Perez-Oso et al., 1989). En células SH-SY5Y, nosotros no hemos observado cambios en el número de receptores ni en la unión de SRIF a su receptor por efecto del tratamiento con haloperidol 50 μ M (Fig 41 y Tabla 7), pero sí hemos detectado una disminución de la actividad basal de la AC y de la inhibición de la AC por efecto de SRIF (Tabla 8). Estos efectos los atribuimos a la modificación de los “lipid rafts” por el efecto inhibitorio del haloperidol sobre la colesterogénesis, puesto que el tratamiento conjunto con colesterol libre evitó los efectos del haloperidol en este aspecto (Tabla 8). En otros estudios, se ha observado que la disminución en los niveles de colesterol también afecta la actividad AC acoplada a otros GPCRs, como el receptor 5-HT₇ (hidroxitriptamina o serotonina), en diversos sistemas celulares (Whetton et al., 1983). Recientemente, el tratamiento subcrónico con haloperidol se ha descrito que reduce la estimulación máxima de la actividad de proteínas G acopladas al receptor de cannabinoides 1 en ratas (Wiley et al., 2008). Teniendo en cuenta estas observaciones y las nuestras, parece claro que el haloperidol puede alterar la señalización mediada por proteínas G como consecuencia de la desestructuración de los “lipid rafts” que produce.

La inhibición de la actividad de la AC mediada por SRIF puede deberse a una menor disponibilidad de proteínas G capaces de interaccionar con su receptor. Tanto receptores de dopamina D₂, como ssts están acoplados a proteínas G. Dado que el tratamiento con antipsicóticos aumenta los niveles de receptores D₂ (Kabbani and Levenson, 2006), esto puede suponer una disminución en la cantidad de proteínas G disponibles para los ssts, disminuyendo así la actividad mediada por estos últimos receptores. El caso es que la posible disminución de los niveles de proteínas G en los “lipid rafts” por efecto del haloperidol, no se ha podido confirmar (Kaplan et al., 1999; Meller and Bohmaker, 1996; Shin et al., 1995).

En cuanto a la AC, proteína efectora de la señalización mediada por SRIF, el tratamiento de animales de experimentación con haloperidol produce un aumento en la actividad de esta proteína por acción de proteínas G α o nucleótidos de guanina (Kaneko et al., 1992; Kaplan et al., 1999; Treisman et al., 1986), así como aumentos en la unión del AMPc a la PKA y en la actividad catalítica de esta proteína y en la expresión de sus subunidades RII α y RII β (Dwivedi et al., 2002). En este mismo sentido, nuestros resultados indican un aumento de la actividad de la AC por estimulación con FK en las células SH-SY5Y tratadas con haloperidol (Tabla 8).

Generalmente se ha asumido que el haloperidol es un antagonista puro de los receptores dopaminérgicos. Sin embargo, se ha demostrado que, en humanos, el haloperidol, como otros antipsicóticos, es en realidad un agonista inverso de los receptores D₂, ya que aumenta la acumulación de AMPc ante estimulación con FK (Hall and Strange, 1997). Confirmando estos datos, nosotros demostramos que el aumento de la actividad de la AC por estimulación con FK provocado por el haloperidol no se evita con el tratamiento conjunto con colesterol, lo cual indica que es un efecto directo del haloperidol independiente de los cambios en la composición en esteroides de la membrana. La posibilidad de que la acción del haloperidol se asocie con la activación de la vía AMPc/PKA viene apoyada por el hecho de que el haloperidol no produce catalepsia y activación de la expresión génica en ratones deficientes de PKA en comparación con ratones “wildtype” (Adams et al., 1997).

Igual que otros antipsicóticos, el haloperidol provoca diversos efectos secundarios, como síntomas extrapiramidales y alteraciones metabólicas. La desestabilización de los “lipid rafts” y la consecuente disfunción de la señalización por insulina y SRIF, provocada por la inhibición de la biosíntesis de colesterol, podría ser la responsable de los efectos desfavorables producidos por la administración del haloperidol durante largos periodos de tiempo.

4. El colesterol como modulador del ciclo celular

Aunque en el presente estudio nosotros no hemos encontrado que la inhibición de la biosíntesis de colesterol afecte la división mitótica de las células 3T3-L1 tras la inducción de su diferenciación, en otros tipos celulares (MOLT-4 y HL-60) se ha observado repetidamente que la deficiencia de colesterol provoca la parada del ciclo celular en G2/M (Fernandez et al., 2005; Martinez-Botas et al., 1999; Sanchez-Martin et al., 2007; Suarez et al., 2005). Paralelamente a esta parada del ciclo celular, se observó una disminución en la actividad de la Cdk1, quinasa responsable de controlar el tránsito entre G2/M y que depende de la ciclina B1 para ser activa (Martinez-Botas et al., 1999; Suarez et al., 2002). De forma interesante, la provisión de colesterol a las células tratadas con el inhibidor SKF 104976, se acompañaba de un rápido incremento de la expresión de ciclina B1, tanto a nivel de mRNA como de proteína, y del aumento de la actividad del complejo Cdk1-ciclina B (Fernández Hernando, 2003; Ledo Trujillo, 2005; Suarez et al., 2002). Estos efectos del colesterol no se encontraban cuando, en vez de colesterol, el medio se suplementaba con otros esteroides, lo cual indica que la respuesta al colesterol era específica (Fernández Hernando, 2003; Ledo Trujillo, 2005; Suarez et al., 2002). Con estos antecedentes decidimos profundizar en la regulación de la expresión del gen de la ciclina B1 por acción del colesterol.

Utilizando construcciones del promotor de la ciclina B1 humana, transfectadas en células MOLT-4, hemos observado que la inhibición de la síntesis de colesterol por acción del SKF 104976 provoca una disminución en su actividad transcripcional (Fig 42B). Este efecto se evita añadiendo colesterol-LDL al medio. Tal comportamiento se mantuvo en clones con deleciones secuenciales del promotor, pero se perdió cuando se eliminaba la secuencia localizada entre las -87 y -52 pb (región entre el clon 8 y 14) (Fig 42A). En esta región encontramos un elemento que con elevada probabilidad respondería al factor de transcripción USF (Tabla 9). El USF es uno de los factores más importantes para el control de la transición entre las fases de S y G2/M (Cogswell et al., 1995), aunque se le atribuyen funciones dispares dependiendo del tipo celular. En células HeLa, deleciones del elemento de respuesta a USF resultan en una disminución del 40% en la actividad del promotor de la ciclina B1 (Cogswell et al., 1995), pero en células FRTL-5, su sobreexpresión provoca un descenso en los niveles de mensajero de ciclina B1, conduciendo a un retraso en el paso a través de G2/M en el ciclo celular, acompañado de un descenso en la expresión de Cdk1 (Jung et al., 2007). Estas observaciones contradictorias podrían explicarse teniendo en cuenta la participación de otros elementos de respuesta en el control de la expresión de la ciclina B1, ya que al deleccionar también la secuencia consenso para AP-2, la actividad del promotor disminuye todavía más (Cogswell et al., 1995).

El factor USF también está implicado en la regulación de genes del metabolismo del colesterol, como el gen de ABCA1 (Yang et al., 2002c). En este caso, ejerce un efecto inhibitorio sobre la expresión de ABCA1 mediante la unión a un E-box de su región promotora (Yang et al., 2002c). Por tanto, existe la posibilidad de que participe en la regulación de la transcripción mediada por esteroides a través de su unión a este elemento E-box (Yang et al., 2002c). De hecho la región candidata objeto de nuestro estudio, como posible elemento de respuesta a USF regulado por esteroides, presenta cierta similitud con la región consenso de E-box (CACGTG).

Para determinar la relevancia de este elemento de respuesta a USF en los efectos del colesterol procedimos a su mutación. Observamos que el clon con este elemento de respuesta mutado no respondía al tratamiento con SKF 104976 disminuyendo la actividad transcripcional del promotor de la ciclina B1 y tampoco se activaba al añadir colesterol al medio (Fig 43B). Por lo tanto, los resultados indican que efectivamente este elemento de respuesta media la respuesta a los cambios de concentración de colesterol en la célula. Se conoce que este factor

de transcripción, en muchas ocasiones es incapaz de activar por sí solo la transcripción de algunos genes (Cogswell et al., 1995). En otros promotores, como es el caso del gen de la lipasa hepática, el USF aumenta la actividad del promotor entre 4 y 6 veces respecto de su actividad basal, mientras que la atorvastatina, que aumenta los niveles de SREBP, evita dicho aumento. Por tanto, el SREBP interfiere en la estimulación del promotor por parte del USF y además parece que esta interacción entre estos dos factores es independiente de sitios SRE o E-box. (Botma et al., 2005). En el caso del promotor de la sintasa de ácidos grasos se ha observado que sin la unión del USF a su promotor, la activación mediada por SREBP-1c disminuye considerablemente (Griffin et al., 2007). Además, su actividad máxima en respuesta a la insulina sólo se consigue por la interacción entre USF y SREBP-1c (Griffin et al., 2007).

El presente estudio permite describir, por vez primera, un elemento de respuesta en el promotor del gen de la ciclina B1 a través del cual el colesterol puede participar en la regulación del ciclo celular. Si es el USF el factor de transcripción que se une a esta secuencia o si interacciona con otros factores para inhibir la transcripción del gen de la ciclina B1 ante la inhibición de la colesterogénesis, está aún por determinar. A pesar de que en otros promotores interacciona con SREBP para regular la transcripción de los genes anteriormente mencionados, observaciones previas de Suárez y colaboradores (Suarez et al., 2002) en las que el ergosterol, capaz de activar la maquinaria de los SREBPs, no aumenta la expresión de ciclina B1, sugieren que la regulación de la expresión de este gen por esteroides tiene lugar a través de mecanismos independientes de SREBP. Apoyando esta línea de pensamiento, parece que el papel de SREBP en el ciclo está más presente en mitosis que en la transición entre G2 y M, que es donde debería expresarse máximamente la ciclina B1. La estabilización en mitosis de las formas maduras de SREBP-1, por fosforilación mediada por el complejo Cdk1/Ciclina B, sería importante para asegurar a las células una cantidad suficiente de factores activos que se encarguen de mantener la síntesis lipídica necesaria durante esta fase final del ciclo (Bengoechea-Alonso and Ericsson, 2006).

Los resultados sugieren que USF puede estar mediando el efecto del colesterol sobre el ciclo celular, sin embargo, desconocemos el mecanismo a través del cual se produce, es decir, cómo se detectan los niveles de colesterol para este fin y cómo se transmite la señal. Los oxisteroides, derivados oxigenados del colesterol, afectan la progresión del ciclo celular impidiendo el paso a través de G2/M y disminuyen los niveles de ciclina B1 (Lim et al., 2003). No obstante, los oxisteroides son conocidos inhibidores de la biosíntesis de colesterol y se insertan en la bicapas lipídicas alterando su estructura. Es interesante el hecho de que agentes que afectan la composición de las membranas pueden alterar el ciclo celular (Lim et al., 2003). Asimismo, el descenso del contenido de colesterol en las membranas, provocado por la β MCD, confiere a las células resistencia ante la detención en G2 provocada por la holotoxina Cdt (*Cytolethal distending toxin*), ya que imposibilita la unión de dos de sus tres subunidades a los "lipid rafts", afectando su funcionalidad (Boesze-Battaglia et al., 2006). Por tanto, cambios en la estructura de estos microdominios de membrana pueden provocar cambios en la regulación del ciclo celular. En el presente trabajo, hemos descrito la disfunción de varios procesos celulares por la alteración en la estructura y funcionalidad de los "lipid rafts". Se sabe que en presencia de SKF 104976, el ergosterol es capaz de incorporarse a las membranas celulares y, sin embargo, la expresión de la ciclina B1 permanece disminuida y las células son retenidas en G2/M (Suarez et al., 2002). Existe, por tanto, la posibilidad de que el ergosterol, aun sustituyendo al colesterol en las membranas, no sea capaz de reemplazarlo en el mantenimiento de la funcionalidad de los "lipid rafts", afectando alguna señal celular que le indique a la célula la imposibilidad de progresar a lo largo del ciclo celular ante unos niveles insuficientes de colesterol en la membrana para formar las membranas de las dos células hijas. Esta podría ser una manera de transmitir a la célula la imposibilidad de mantener la integridad de la membrana ante un descenso de la concentración de colesterol en los "lipid rafts",

microdominios necesarios para el correcto funcionamiento de la fisiología celular. Ante esta situación la célula disminuiría la expresión de la ciclina B y detendría su proliferación, en espera de poder proveerse de suficiente colesterol y proseguir con el ciclo celular. La posibilidad de que el colesterol, como apuntan estos resultados, pueda regular la transcripción de genes claves en la progresión del ciclo celular, subraya la importancia de este lípido en este proceso central en biología celular.

Conclusiones

Conclusiones

1. La inhibición de la biosíntesis de colesterol bloquea la adipogénesis de los preadipocitos 3T3-L1, como lo demuestra la disminución de la expresión de factores necesarios para la diferenciación como son PPAR γ , C/EBP α y LXR α y de proteínas específicas de los adipocitos maduros como aP2 y adiposina y, en último término, la falta de acumulación de gotas lipídicas en el citoplasma celular. Estos efectos se evitan añadiendo colesterol al medio de incubación lo que demuestra su especificidad.
2. Este efecto de la deficiencia experimental de colesterol sobre la adipogénesis no parece deberse a una alteración en la fase inicial de expansión clonal del proceso sino a la inhibición de la fosforilación de C/EBP β en Thr188, consecuencia de la falta de activación de ERK1/2.
3. El tratamiento de los preadipocitos 3T3-L1 con distintos inhibidores de la colesterogénesis provoca un descenso del contenido de colesterol en la membrana celular, tanto en los dominios denominados "lipid rafts" como en los no "raft", que viene compensado en parte por la incorporación de los distintos esteroides intermediarios de la ruta de síntesis según sean las enzimas afectadas en cada caso.
4. La alteración de la composición en esteroides de los "lipid rafts" se acompaña de importantes cambios en la distribución de componentes característicos de estos dominios, como la caveolina-1 y el gangliósido GM1.
5. La desestructuración de los "lipid rafts" así establecida, afecta la activación del receptor de la insulina, la deslocalización de la proteína acopladora Fyn, la fosforilación de Akt y, en último caso, la captación de glucosa estimulada por insulina.
6. El haloperidol, a dosis terapéuticamente relevantes, inhibe la biosíntesis de colesterol afectando las actividades enzimáticas de la Δ^7 -reductasa, la $\Delta^{8,7}$ -isomerasa y la Δ^{14} -reductasa en orden decreciente. Así, el tratamiento de las células de neuroblastoma SH-SH5Y con este antipsicótico reduce la presencia de colesterol en los "lipid rafts" y aumenta la de 8,14-colestadien-3 β -ol y otros esteroides intermediarios, según la dosis de haloperidol que se emplee. La adición de colesterol al medio evita el descenso del contenido de colesterol en esos dominios pero no consigue desplazar completamente los intermediarios acumulados.
7. La inhibición de la síntesis de colesterol causada por el haloperidol en las células SH-SY5Y provoca la disociación de la flotilina y el GM1 de los "lipid rafts", hecho que conduce a una alteración de su funcionalidad afectando la señalización mediada tanto por la insulina como por la somatostatina
8. Estos efectos del haloperidol se evitan añadiendo al medio colesterol libre, disuelto en etanol, lo que demuestra que la causa de dichas alteraciones es la carencia de colesterol. Las LDL, vehículos fisiológicos del colesterol en plasma, fueron menos eficaces previniendo los efectos del haloperidol, debido a que este fármaco interfiere en el transporte intracelular de colesterol, impidiendo que el colesterol de las LDL salga de los lisosomas y pueda alcanzar la membrana plasmática.

9. La deficiencia de colesterol disminuye la expresión de la ciclina B1. Este efecto está mediado por el elemento de respuesta a USF situado a -77 pb del inicio de la transcripción en el promotor de este gen, el cual permite la modulación de la expresión máxima de esta ciclina según la disponibilidad de colesterol en la fase G2 del ciclo celular.

Bibliografía

- Aachmann, F.L., Otzen, D.E., Larsen, K.L. and Wimmer, R. (2003) Structural background of cyclodextrin-protein interactions. *Protein Eng*, **16**, 905-912.
- Adams, M.R., Brandon, E.P., Chartoff, E.H., Idzerda, R.L., Dorsa, D.M. and McKnight, G.S. (1997) Loss of haloperidol induced gene expression and catalepsy in protein kinase A-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 12157-12161.
- Aleck, K.A. and Bartley, D.L. (1997) Multiple malformation syndrome following fluconazole use in pregnancy: report of an additional patient. *Am J Med Genet*, **72**, 253-256.
- Alimohamad, H., Rajakumar, N., Seah, Y.H. and Rushlow, W. (2005) Antipsychotics alter the protein expression levels of beta-catenin and GSK-3 in the rat medial prefrontal cortex and striatum. *Biol Psychiatry*, **57**, 533-542.
- Allison, D.B., Mentore, J.L., Heo, M., Chandler, L.P., Cappelleri, J.C., Infante, M.C. and Weiden, P.J. (1999) Antipsychotic-induced weight gain: a comprehensive research synthesis. *Am J Psychiatry*, **156**, 1686-1696.
- Altiock, S., Xu, M. and Spiegelman, B.M. (1997) PPARgamma induces cell cycle withdrawal: inhibition of E2F/DP DNA-binding activity via down-regulation of PP2A. *Genes Dev*, **11**, 1987-1998.
- Amemiya-Kudo, M., Shimano, H., Hasty, A.H., Yahagi, N., Yoshikawa, T., Matsuzaka, T., Okazaki, H., Tamura, Y., Iizuka, Y., Ohashi, K., Osuga, J., Harada, K., Gotoda, T., Sato, R., Kimura, S., Ishibashi, S. and Yamada, N. (2002) Transcriptional activities of nuclear SREBP-1a, -1c, and -2 to different target promoters of lipogenic and cholesterologenic genes. *J Lipid Res*, **43**, 1220-1235.
- Andersson, H.C., Kratz, L. and Kelley, R. (2002) Desmosterolosis presenting with multiple congenital anomalies and profound developmental delay. *Am J Med Genet*, **113**, 315-319.
- Andreassen, O.A., Finsen, B., Ostergaard, K., West, M.J. and Jorgensen, H.A. (2000) Reduced number of striatal neurons expressing preprosomatostatin mRNA in rats with oral dyskinesias after long-term haloperidol administration. *Neurosci Lett*, **279**, 21-24.
- Aouadi, M., Binetruy, B., Caron, L., Le Marchand-Brustel, Y. and Bost, F. (2006a) Role of MAPKs in development and differentiation: lessons from knockout mice. *Biochimie*, **88**, 1091-1098.
- Aouadi, M., Jager, J., Laurent, K., Gonzalez, T., Cormont, M., Binetruy, B., Le Marchand-Brustel, Y., Tanti, J.F. and Bost, F. (2007) p38MAP Kinase activity is required for human primary adipocyte differentiation. *FEBS Lett*, **581**, 5591-5596.
- Aouadi, M., Laurent, K., Prot, M., Le Marchand-Brustel, Y., Binetruy, B. and Bost, F. (2006b) Inhibition of p38MAPK increases adipogenesis from embryonic to adult stages. *Diabetes*, **55**, 281-289.
- Aufenanger, J., Pill, J., Schmidt, F.H. and Stegmeier, K. (1986) The effects of BM 15.766, an inhibitor of 7-dehydrocholesterol delta 7-reductase, on cholesterol biosynthesis in primary rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol*, **35**, 911-916.
- Auman, H.J., Nottoli, T., Lakiza, O., Winger, Q., Donaldson, S. and Williams, T. (2002) Transcription factor AP-2gamma is essential in the extra-embryonic lineages for early postimplantation development. *Development*, **129**, 2733-2747.
- Avigan, J., Steinberg, D., Vroman, H.E., Thompson, M.J. and Mosettig, E. (1960) Studies of cholesterol biosynthesis. I. The identification of desmosterol in serum and tissues of animals and man treated with MER-29. *J Biol Chem*, **235**, 3123-3126.
- Bai, C., Richman, R. and Elledge, S.J. (1994) Human cyclin F. *Embo J*, **13**, 6087-6098.
- Barenholz, Y. (2002) Cholesterol and other membrane active sterols: from membrane evolution to "rafts". *Prog Lipid Res*, **41**, 1-5.
- Batchvarova, N., Wang, X.Z. and Ron, D. (1995) Inhibition of adipogenesis by the stress-induced protein CHOP (Gadd153). *Embo J*, **14**, 4654-4661.
- Baudry, A., Yang, Z.Z. and Hemmings, B.A. (2006) PKBalpha is required for adipose differentiation of mouse embryonic fibroblasts. *J Cell Sci*, **119**, 889-897.
- Belmonte, N., Phillips, B.W., Massiera, F., Villageois, P., Wdziekonski, B., Saint-Marc, P., Nichols, J., Aubert, J., Saeki, K., Yuo, A., Narumiya, S., Ailhaud, G. and Dani, C. (2001) Activation of extracellular signal-regulated kinases and CREB/ATF-1 mediate the expression of CCAAT/enhancer binding proteins beta and -delta in preadipocytes. *Mol Endocrinol*, **15**, 2037-2049.
- Benarroch, E.E. (2007) Lipid rafts, protein scaffolds, and neurologic disease. *Neurology*, **69**, 1635-1639.

- Bengoechea-Alonso, M.T. and Ericsson, J. (2006) Cdk1/cyclin B-mediated phosphorylation stabilizes SREBP1 during mitosis. *Cell Cycle*, **5**, 1708-1718.
- Bengoechea-Alonso, M.T., Punga, T. and Ericsson, J. (2005) Hyperphosphorylation regulates the activity of SREBP1 during mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 11681-11686.
- Bennett, M.K., Lopez, J.M., Sanchez, H.B. and Osborne, T.F. (1995) Sterol regulation of fatty acid synthase promoter. Coordinate feedback regulation of two major lipid pathways. *J Biol Chem*, **270**, 25578-25583.
- Bergstrom, J.D., Kurtz, M.M., Rew, D.J., Amend, A.M., Karkas, J.D., Bostedor, R.G., Bansal, V.S., Dufresne, C., VanMiddlesworth, F.L., Hensens, O.D. and et al. (1993) Zaragozic acids: a family of fungal metabolites that are picomolar competitive inhibitors of squalene synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 80-84.
- Bey, L., Maigret, P., Laouenan, H. and Hamilton, M.T. (2002) Induction of lipoprotein lipase gene expression in 3T3-L1 preadipocytes by atorvastatin, a cholesterol- and triglyceride-lowering drug. *Pharmacology*, **66**, 51-56.
- Bickel, P.E. (2002) Lipid rafts and insulin signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **282**, E1-E10.
- Bickel, P.E., Scherer, P.E., Schnitzer, J.E., Oh, P., Lisanti, M.P. and Lodish, H.F. (1997) Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins. *J Biol Chem*, **272**, 13793-13802.
- Bjorntorp, P. (1997) Obesity. *Lancet*, **350**, 423-426.
- Boesze-Battaglia, K., Besack, D., McKay, T., Zekavat, A., Otis, L., Jordan-Sciutto, K. and Shenker, B.J. (2006) Cholesterol-rich membrane microdomains mediate cell cycle arrest induced by Actinobacillus actinomycetemcomitans cytolethal-distending toxin. *Cell Microbiol*, **8**, 823-836.
- Bost, F., Aouadi, M., Caron, L. and Binetruy, B. (2005a) The role of MAPKs in adipocyte differentiation and obesity. *Biochimie*, **87**, 51-56.
- Bost, F., Aouadi, M., Caron, L., Even, P., Belmonte, N., Prot, M., Dani, C., Hofman, P., Pages, G., Pouyssegur, J., Le Marchand-Brustel, Y. and Binetruy, B. (2005b) The extracellular signal-regulated kinase isoform ERK1 is specifically required for in vitro and in vivo adipogenesis. *Diabetes*, **54**, 402-411.
- Botma, G.J., van Deursen, D., Vieira, D., van Hoek, M., Jansen, H. and Verhoeven, A.J. (2005) Sterol-regulatory-element binding protein inhibits upstream stimulatory factor-stimulated hepatic lipase gene expression. *Atherosclerosis*, **179**, 61-67.
- Browman, D.T., Hoegg, M.B. and Robbins, S.M. (2007) The SPFH domain-containing proteins: more than lipid raft markers. *Trends Cell Biol*, **17**, 394-402.
- Brown, D.A. and London, E. (1998) Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *J Membr Biol*, **164**, 103-114.
- Brown, D.A. and Rose, J.K. (1992) Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell*, **68**, 533-544.
- Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (1974) Suppression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and inhibition of growth of human fibroblasts by 7-ketocholesterol. *J Biol Chem*, **249**, 7306-7314.
- Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (1999) A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 11041-11048.
- Brusselmans, K., Timmermans, L., Van de Sande, T., Van Veldhoven, P.P., Guan, G., Shechter, I., Claessens, F., Verhoeven, G. and Swinnen, J.V. (2007) Squalene synthase, a determinant of Raft-associated cholesterol and modulator of cancer cell proliferation. *J Biol Chem*, **282**, 18777-18785.
- Buckley, M.F., Sweeney, K.J., Hamilton, J.A., Sini, R.L., Manning, D.L., Nicholson, R.I., deFazio, A., Watts, C.K., Musgrove, E.A. and Sutherland, R.L. (1993) Expression and amplification of cyclin genes in human breast cancer. *Oncogene*, **8**, 2127-2133.
- Cabrera-Poch, N., Sanchez-Ruiloba, L., Rodriguez-Martinez, M. and Iglesias, T. (2004) Lipid raft disruption triggers protein kinase C and Src-dependent protein kinase D activation and Kidins220 phosphorylation in neuronal cells. *J Biol Chem*, **279**, 28592-28602.
- Calvo, D., Gomez-Coronado, D., Suarez, Y., Lasuncion, M.A. and Vega, M.A. (1998) Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL. *J Lipid Res*, **39**, 777-788.
- Camp, H.S. and Tafuri, S.R. (1997) Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, **272**, 10811-10816.

- Camp, H.S., Tafuri, S.R. and Leff, T. (1999) c-Jun N-terminal kinase phosphorylates peroxisome proliferator-activated receptor-gamma1 and negatively regulates its transcriptional activity. *Endocrinology*, **140**, 392-397.
- Cao, Z., Umek, R.M. and McKnight, S.L. (1991) Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev*, **5**, 1538-1552.
- Casey, P.J. (1995) Protein lipidation in cell signaling. *Science*, **268**, 221-225.
- Chawla, A., Boisvert, W.A., Lee, C.H., Laffitte, B.A., Barak, Y., Joseph, S.B., Liao, D., Nagy, L., Edwards, P.A., Curtiss, L.K., Evans, R.M. and Tontonoz, P. (2001) A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell*, **7**, 161-171.
- Chen, H.W., Kandutsch, A.A. and Waymouth, C. (1974) Inhibition of cell growth by oxygenated derivatives of cholesterol. *Nature*, **251**, 419-421.
- Cheung, E., Mayr, P., Coda-Zabetta, F., Woodman, P.G. and Boam, D.S. (1999) DNA-binding activity of the transcription factor upstream stimulatory factor 1 (USF-1) is regulated by cyclin-dependent phosphorylation. *Biochem J*, **344 Pt 1**, 145-152.
- Chini, B. and Parenti, M. (2004) G-protein coupled receptors in lipid rafts and caveolae: how, when and why do they go there? *J Mol Endocrinol*, **32**, 325-338.
- Chinnapen, D.J., Chinnapen, H., Saslowsky, D. and Lencer, W.I. (2007) Rafting with cholera toxin: endocytosis and trafficking from plasma membrane to ER. *FEMS Microbiol Lett*, **266**, 129-137.
- Christy, R.J., Kaestner, K.H., Geiman, D.E. and Lane, M.D. (1991) CCAAT/enhancer binding protein gene promoter: binding of nuclear factors during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 2593-2597.
- Chun, M., Liyanage, U.K., Lisanti, M.P. and Lodish, H.F. (1994) Signal transduction of a G protein-coupled receptor in caveolae: colocalization of endothelin and its receptor with caveolin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 11728-11732.
- Clayton, P.T. (1998) Disorders of cholesterol biosynthesis. *Arch Dis Child*, **78**, 185-189.
- Cogswell, J.P., Godlevski, M.M., Bonham, M., Bisi, J. and Babiss, L. (1995) Upstream stimulatory factor regulates expression of the cell cycle-dependent cyclin B1 gene promoter. *Mol Cell Biol*, **15**, 2782-2790.
- Coller, H.A., Sang, L. and Roberts, J.M. (2006) A new description of cellular quiescence. *PLoS Biol*, **4**, e83.
- Couillard, C., Mauriege, P., Imbeault, P., Prud'homme, D., Nadeau, A., Tremblay, A., Bouchard, C. and Despres, J.P. (2000) Hyperleptinemia is more closely associated with adipose cell hypertrophy than with adipose tissue hyperplasia. *Int J Obes Relat Metab Disord*, **24**, 782-788.
- Curry, C.J., Carey, J.C., Holland, J.S., Chopra, D., Fineman, R., Golabi, M., Sherman, S., Pagon, R.A., Allanson, J., Shulman, S. and et al. (1987) Smith-Lemli-Opitz syndrome-type II: multiple congenital anomalies with male pseudohermaphroditism and frequent early lethality. *Am J Med Genet*, **26**, 45-57.
- Czernik, A.J. and Petrack, B. (1983) Somatostatin receptor binding in rat cerebral cortex. Characterization using a nonreducible somatostatin analog. *J Biol Chem*, **258**, 5525-5530.
- Dai, Y., Wei, Z., Sephton, C.F., Zhang, D., Anderson, D.H. and Mousseau, D.D. (2007) Haloperidol induces the nuclear translocation of phosphatidylinositol 3'-kinase to disrupt Akt phosphorylation in PC12 cells. *J Psychiatry Neurosci*, **32**, 323-330.
- Datta, S.R., Brunet, A. and Greenberg, M.E. (1999) Cellular survival: a play in three Acts. *Genes Dev*, **13**, 2905-2927.
- Davis, M.E. and Brewster, M.E. (2004) Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov*, **3**, 1023-1035.
- Degroote, S., Wolthoorn, J. and van Meer, G. (2004) The cell biology of glycosphingolipids. *Semin Cell Dev Biol*, **15**, 375-387.
- Derry, J.M., Gormally, E., Means, G.D., Zhao, W., Meindl, A., Kelley, R.I., Boyd, Y. and Herman, G.E. (1999) Mutations in a delta 8-delta 7 sterol isomerase in the tattered mouse and X-linked dominant chondrodysplasia punctata. jderry@immunex.com. *Nat Genet*, **22**, 286-290.
- Donati, R.J. and Rasenick, M.M. (2005) Chronic antidepressant treatment prevents accumulation of galpha in cholesterol-rich, cytoskeletal-associated, plasma membrane domains (lipid rafts). *Neuropsychopharmacology*, **30**, 1238-1245.

- Dooley, K.A., Bennett, M.K. and Osborne, T.F. (1999) A critical role for cAMP response element-binding protein (CREB) as a Co-activator in sterol-regulated transcription of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase promoter. *J Biol Chem*, **274**, 5285-5291.
- Dooley, K.A., Millinder, S. and Osborne, T.F. (1998) Sterol regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase gene through a direct interaction between sterol regulatory element binding protein and the trimeric CCAAT-binding factor/nuclear factor Y. *J Biol Chem*, **273**, 1349-1356.
- Dournaud, P., Jazat-Poindessous, F., Slama, A., Lamour, Y. and Epelbaum, J. (1996) Correlations between water maze performance and cortical somatostatin mRNA and high-affinity binding sites during ageing in rats. *Eur J Neurosci*, **8**, 476-485.
- Dugail, I., Le Lay, S., Varret, M., Le Liepvre, X., Dagher, G. and Ferre, P. (2003) New insights into how adipocytes sense their triglyceride stores. Is cholesterol a signal? *Horm Metab Res*, **35**, 204-210.
- Dujovne, C.A. (1997) New lipid lowering drugs and new effects of old drugs. *Curr Opin Lipidol*, **8**, 362-368.
- Dwivedi, Y., Rizavi, H.S. and Pandey, G.N. (2002) Differential effects of haloperidol and clozapine on [(3)H]cAMP binding, protein kinase A (PKA) activity, and mRNA and protein expression of selective regulatory and catalytic subunit isoforms of PKA in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther*, **301**, 197-209.
- Dwyer, D.S., Pinkofsky, H.B., Liu, Y. and Bradley, R.J. (1999) Antipsychotic drugs affect glucose uptake and the expression of glucose transporters in PC12 cells. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, **23**, 69-80.
- Eehalt, R., Keller, P., Haass, C., Thiele, C. and Simons, K. (2003) Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol*, **160**, 113-123.
- Eisensamer, B., Uhr, M., Meyr, S., Gimpl, G., Deiml, T., Rammes, G., Lambert, J.J., Zieglgansberger, W., Holsboer, F. and Rupprecht, R. (2005) Antidepressants and antipsychotic drugs colocalize with 5-HT₃ receptors in raft-like domains. *J Neurosci*, **25**, 10198-10206.
- Emamian, E.S., Hall, D., Birnbaum, M.J., Karayiorgou, M. and Gogos, J.A. (2004) Convergent evidence for impaired AKT1-GSK3 β signaling in schizophrenia. *Nat Genet*, **36**, 131-137.
- Engelman, J.A., Berg, A.H., Lewis, R.Y., Lin, A., Lisanti, M.P. and Scherer, P.E. (1999) Constitutively active mitogen-activated protein kinase kinase 6 (MKK6) or salicylate induces spontaneous 3T3-L1 adipogenesis. *J Biol Chem*, **274**, 35630-35638.
- Engelman, J.A., Lisanti, M.P. and Scherer, P.E. (1998) Specific inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase block 3T3-L1 adipogenesis. *J Biol Chem*, **273**, 32111-32120.
- Erol, A. (2005) The role of fat tissue in the cholesterol lowering and the pleiotropic effects of statins--statins activate the generation of metabolically more capable adipocytes. *Med Hypotheses*, **64**, 69-73.
- Espenshade, P.J., Li, W.P. and Yabe, D. (2002) Sterols block binding of COPII proteins to SCAP, thereby controlling SCAP sorting in ER. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 11694-11699.
- Faisst, S. and Meyer, S. (1992) Compilation of vertebrate-encoded transcription factors. *Nucleic Acids Res*, **20**, 3-26.
- Fajas, L., Auboeuf, D., Raspe, E., Schoonjans, K., Lefebvre, A.M., Saladin, R., Najib, J., Laville, M., Fruchart, J.C., Deeb, S., Vidal-Puig, A., Flier, J., Briggs, M.R., Staels, B., Vidal, H. and Auwerx, J. (1997) The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR γ gene. *J Biol Chem*, **272**, 18779-18789.
- Fajas, L., Fruchart, J.C. and Auwerx, J. (1998) Transcriptional control of adipogenesis. *Curr Opin Cell Biol*, **10**, 165-173.
- Fajas, L., Schoonjans, K., Gelman, L., Kim, J.B., Najib, J., Martin, G., Fruchart, J.C., Briggs, M., Spiegelman, B.M. and Auwerx, J. (1999) Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism. *Mol Cell Biol*, **19**, 5495-5503.
- Farese, R.V., Jr. and Herz, J. (1998) Cholesterol metabolism and embryogenesis. *Trends Genet*, **14**, 115-120.

- Farina, A., Gaetano, C., Crescenzi, M., Puccini, F., Manni, I., Sacchi, A. and Piaggio, G. (1996) The inhibition of cyclin B1 gene transcription in quiescent NIH3T3 cells is mediated by an E-box. *Oncogene*, **13**, 1287-1296.
- Farina, A., Manni, I., Fontemaggi, G., Tiainen, M., Cenciarelli, C., Bellorini, M., Mantovani, R., Sacchi, A. and Piaggio, G. (1999) Down-regulation of cyclin B1 gene transcription in terminally differentiated skeletal muscle cells is associated with loss of functional CCAAT-binding NF-Y complex. *Oncogene*, **18**, 2818-2827.
- Farmer, S.R. (2006) Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab*, **4**, 263-273.
- Fernandez, C., Martin, M., Gomez-Coronado, D. and Lasuncion, M.A. (2005) Effects of distal cholesterol biosynthesis inhibitors on cell proliferation and cell cycle progression. *J Lipid Res*, **46**, 920-929.
- Fernandez, C., Suarez, Y., Ferruelo, A.J., Gomez-Coronado, D. and Lasuncion, M.A. (2002) Inhibition of cholesterol biosynthesis by Delta22-unsaturated phytosterols via competitive inhibition of sterol Delta24-reductase in mammalian cells. *Biochem J*, **366**, 109-119.
- Fernández Hernando, C. (2003) Efecto de los esteroides sobre la biosíntesis de colesterol, proliferación y diferenciación celular. *Tesis doctoral*.
- Ferno, J., Raeder, M.B., Vik-Mo, A.O., Skrede, S., Glambek, M., Tronstad, K.J., Breilid, H., Lovlie, R., Berge, R.K., Stansberg, C. and Steen, V.M. (2005) Antipsychotic drugs activate SREBP-regulated expression of lipid biosynthetic genes in cultured human glioma cells: a novel mechanism of action? *Pharmacogenomics J*, **5**, 298-304.
- Ferno, J., Skrede, S., Vik-Mo, A.O., Havik, B. and Steen, V.M. (2006) Drug-induced activation of SREBP-controlled lipogenic gene expression in CNS-related cell lines: marked differences between various antipsychotic drugs. *BMC Neurosci*, **7**, 69.
- FitzPatrick, D.R., Keeling, J.W., Evans, M.J., Kan, A.E., Bell, J.E., Porteous, M.E., Mills, K., Winter, R.M. and Clayton, P.T. (1998) Clinical phenotype of desmosterolosis. *Am J Med Genet*, **75**, 145-152.
- Flier, J.S. and Hollenberg, A.N. (1999) ADD-1 provides major new insight into the mechanism of insulin action. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 14191-14192.
- Folch, J., Lees, M. and Sloane Stanley, G.H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*, **226**, 497-509.
- Foretz, M., Guichard, C., Ferre, P. and Foufelle, F. (1999) Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 12737-12742.
- Francis, G.A., Fayard, E., Picard, F. and Auwerx, J. (2003) Nuclear receptors and the control of metabolism. *Annu Rev Physiol*, **65**, 261-311.
- Furtado, L.M., Somwar, R., Sweeney, G., Niu, W. and Klip, A. (2002) Activation of the glucose transporter GLUT4 by insulin. *Biochem Cell Biol*, **80**, 569-578.
- Gagnon, A., Chen, C.S. and Sorisky, A. (1999) Activation of protein kinase B and induction of adipogenesis by insulin in 3T3-L1 preadipocytes: contribution of phosphoinositide-3,4,5-trisphosphate versus phosphoinositide-3,4-bisphosphate. *Diabetes*, **48**, 691-698.
- Garcia de Herreros, A. and Birnbaum, M.J. (1989) The acquisition of increased insulin-responsive hexose transport in 3T3-L1 adipocytes correlates with expression of a novel transporter gene. *J Biol Chem*, **264**, 19994-19999.
- Gielen, E., Baron, W., Vandeven, M., Steels, P., Hoekstra, D. and Ameloot, M. (2006) Rafts in oligodendrocytes: evidence and structure-function relationship. *Glia*, **54**, 499-512.
- Giera, M., Plossl, F. and Bracher, F. (2007) Fast and easy in vitro screening assay for cholesterol biosynthesis inhibitors in the post-squalene pathway. *Steroids*, **72**, 633-642.
- Girgis, R.R., Javitch, J.A. and Lieberman, J.A. (2008) Antipsychotic drug mechanisms: links between therapeutic effects, metabolic side effects and the insulin signaling pathway. *Mol Psychiatry*, **13**, 918-929.
- Gong, J., Ardelt, B., Traganos, F. and Darzynkiewicz, Z. (1994) Unscheduled expression of cyclin B1 and cyclin E in several leukemic and solid tumor cell lines. *Cancer Res*, **54**, 4285-4288.
- Gonzalez, G.A. and Montminy, M.R. (1989) Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell*, **59**, 675-680.
- Grana, X. and Reddy, E.P. (1995) Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene*, **11**, 211-219.

- Grange, D.K., Kratz, L.E., Braverman, N.E. and Kelley, R.I. (2000) CHILD syndrome caused by deficiency of 3beta-hydroxysteroid-delta8, delta7-isomerase. *Am J Med Genet*, **90**, 328-335.
- Green, H. and Kehinde, O. (1975) An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell*, **5**, 19-27.
- Green, H. and Meuth, M. (1974) An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell*, **3**, 127-133.
- Greenberg, C.R., Rimoin, D.L., Gruber, H.E., DeSa, D.J., Reed, M. and Lachman, R.S. (1988) A new autosomal recessive lethal chondrodystrophy with congenital hydrops. *Am J Med Genet*, **29**, 623-632.
- Greenwood, F.C., Hunter, W.M. and Glover, J.S. (1963) The Preparation of I-131-Labelled Human Growth Hormone of High Specific Radioactivity. *Biochem J*, **89**, 114-123.
- Gregoire, F.M., Smas, C.M. and Sul, H.S. (1998) Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev*, **78**, 783-809.
- Griffin, M.J., Wong, R.H., Pandya, N. and Sul, H.S. (2007) Direct interaction between USF and SREBP-1c mediates synergistic activation of the fatty-acid synthase promoter. *J Biol Chem*, **282**, 5453-5467.
- Guo, W., Zhang, K.M., Tu, K., Li, Y.X., Zhu, L., Xiao, H.S., Yang, Y. and Wu, J.R. (2009) Adipogenesis licensing and execution are disparately linked to cell proliferation. *Cell Res*, **19**, 216-223.
- Guo, X. and Liao, K. (2000) Analysis of gene expression profile during 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Gene*, **251**, 45-53.
- Gupta, S.K. and Mishra, R.K. (1992) Effects of chronic treatment of haloperidol and clozapine on levels of G-protein subunits in rat striatum. *J Mol Neurosci*, **3**, 197-201.
- Gustavsson, J., Parpal, S., Karlsson, M., Ramsing, C., Thorn, H., Borg, M., Lindroth, M., Peterson, K.H., Magnusson, K.E. and Stralfors, P. (1999) Localization of the insulin receptor in caveolae of adipocyte plasma membrane. *Faseb J*, **13**, 1961-1971.
- Hall, D.A. and Strange, P.G. (1997) Evidence that antipsychotic drugs are inverse agonists at D2 dopamine receptors. *Br J Pharmacol*, **121**, 731-736.
- Hamm, J.K., Park, B.H. and Farmer, S.R. (2001) A role for C/EBPbeta in regulating peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity during adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem*, **276**, 18464-18471.
- Hancock, J.F. (2006) Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 456-462.
- Hanlon, M., Sturgill, T.W. and Sealy, L. (2001) ERK2- and p90(Rsk2)-dependent pathways regulate the CCAAT/enhancer-binding protein-beta interaction with serum response factor. *J Biol Chem*, **276**, 38449-38456.
- Happle, R. (1993) Mosaicism in human skin. Understanding the patterns and mechanisms. *Arch Dermatol*, **129**, 1460-1470.
- Hashemi, S.H., Li, J.Y., Ahlman, H. and Dahlstrom, A. (2003) SSR2(a) receptor expression and adrenergic/cholinergic characteristics in differentiated SH-SY5Y cells. *Neurochem Res*, **28**, 449-460.
- Hashimoto, K. and Ishiwata, K. (2006) Sigma receptor ligands: possible application as therapeutic drugs and as radiopharmaceuticals. *Curr Pharm Des*, **12**, 3857-3876.
- Hata, K., Nishimura, R., Ikeda, F., Yamashita, K., Matsubara, T., Nokubi, T. and Yoneda, T. (2003) Differential roles of Smad1 and p38 kinase in regulation of peroxisome proliferator-activating receptor gamma during bone morphogenetic protein 2-induced adipogenesis. *Mol Biol Cell*, **14**, 545-555.
- Hauner, H., Entenmann, G., Wabitsch, M., Gaillard, D., Ailhaud, G., Negrel, R. and Pfeiffer, E.F. (1989) Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J Clin Invest*, **84**, 1663-1670.
- Havrankova, J., Roth, J. and Brownstein, M.J. (1983) Insulin receptors in brain. *Adv Metab Disord*, **10**, 259-268.
- Head, B.P., Patel, H.H., Roth, D.M., Murray, F., Swaney, J.S., Niesman, I.R., Farquhar, M.G. and Insel, P.A. (2006) Microtubules and actin microfilaments regulate lipid raft/caveolae localization of adenylyl cyclase signaling components. *J Biol Chem*, **281**, 26391-26399.
- Herman, G.E. (2000) X-Linked dominant disorders of cholesterol biosynthesis in man and mouse. *Biochim Biophys Acta*, **1529**, 357-373.
- Herman, G.E. (2003) Disorders of cholesterol biosynthesis: prototypic metabolic malformation syndromes. *Hum Mol Genet*, **12 Spec No 1**, R75-88.

- Hillyard, D.Z., Jardine, A.G., McDonald, K.J. and Cameron, A.J. (2004) Fluvastatin inhibits raft dependent Fcγ receptor signalling in human monocytes. *Atherosclerosis*, **172**, 219-228.
- Hillyard, D.Z., Nutt, C.D., Thomson, J., McDonald, K.J., Wan, R.K., Cameron, A.J., Mark, P.B. and Jardine, A.G. (2007) Statins inhibit NK cell cytotoxicity by membrane raft depletion rather than inhibition of isoprenylation. *Atherosclerosis*, **191**, 319-325.
- Hirosumi, J., Tuncman, G., Chang, L., Gorgun, C.Z., Uysal, K.T., Maeda, K., Karin, M. and Hotamisligil, G.S. (2002) A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*, **420**, 333-336.
- Hong, K.M., Belperio, J.A., Keane, M.P., Burdick, M.D. and Strieter, R.M. (2007) Differentiation of human circulating fibrocytes as mediated by transforming growth factor-beta and peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem*, **282**, 22910-22920.
- Hong, S., Huo, H., Xu, J. and Liao, K. (2004) Insulin-like growth factor-1 receptor signaling in 3T3-L1 adipocyte differentiation requires lipid rafts but not caveolae. *Cell Death Differ*, **11**, 714-723.
- Horton, J.D., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (2002) SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*, **109**, 1125-1131.
- Horton, J.D., Shah, N.A., Warrington, J.A., Anderson, N.N., Park, S.W., Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (2003) Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 12027-12032.
- Horton, J.D., Shimomura, I., Brown, M.S., Hammer, R.E., Goldstein, J.L. and Shimano, H. (1998) Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2. *J Clin Invest*, **101**, 2331-2339.
- Houslay, M.D., Hesketh, T.R., Smith, G.A., Warren, G.B. and Metcalfe, J.C. (1976a) The lipid environment of the glucagon receptor regulates adenylate cyclase activity. *Biochim Biophys Acta*, **436**, 495-504.
- Houslay, M.D., Metcalfe, J.C., Warren, G.B., Hesketh, T.R. and Smith, G.A. (1976b) The glucagon receptor of rat liver plasma membrane can couple to adenylate cyclase without activating it. *Biochim Biophys Acta*, **436**, 489-494.
- Hu, E., Kim, J.B., Sarraf, P. and Spiegelman, B.M. (1996) Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPARγ. *Science*, **274**, 2100-2103.
- Hu, E., Tontonoz, P. and Spiegelman, B.M. (1995) Transdifferentiation of myoblasts by the adipogenic transcription factors PPARγ and C/EBPα. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 9856-9860.
- Hu, J., Roy, S.K., Shapiro, P.S., Rodig, S.R., Reddy, S.P., Platanius, L.C., Schreiber, R.D. and Kalvakolanu, D.V. (2001) ERK1 and ERK2 activate CCAAT/enhancer-binding protein-beta-dependent gene transcription in response to interferon-gamma. *J Biol Chem*, **276**, 287-297.
- Hu, Q., Lu, J.F., Luo, R., Sen, S. and Maity, S.N. (2006) Inhibition of CBF/NF-Υ mediated transcription activation arrests cells at G2/M phase and suppresses expression of genes activated at G2/M phase of the cell cycle. *Nucleic Acids Res*, **34**, 6272-6285.
- Hua, X., Wu, J., Goldstein, J.L., Brown, M.S. and Hobbs, H.H. (1995) Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein-1 (SREBF1) and localization of SREBF1 and SREBF2 to chromosomes 17p11.2 and 22q13. *Genomics*, **25**, 667-673.
- Hummasti, S., Laffitte, B.A., Watson, M.A., Galardi, C., Chao, L.C., Ramamurthy, L., Moore, J.T. and Tontonoz, P. (2004) Liver X receptors are regulators of adipocyte gene expression but not differentiation: identification of apoD as a direct target. *J Lipid Res*, **45**, 616-625.
- Huo, H., Guo, X., Hong, S., Jiang, M., Liu, X. and Liao, K. (2003) Lipid rafts/caveolae are essential for insulin-like growth factor-1 receptor signaling during 3T3-L1 preadipocyte differentiation induction. *J Biol Chem*, **278**, 11561-11569.
- Huster, D., Scheidt, H.A., Arnold, K., Herrmann, A. and Muller, P. (2005) Desmosterol may replace cholesterol in lipid membranes. *Biophys J*, **88**, 1838-1844.
- Hwang, A., Maity, A., McKenna, W.G. and Muschel, R.J. (1995) Cell cycle-dependent regulation of the cyclin B1 promoter. *J Biol Chem*, **270**, 28419-28424.
- Hwang, C.S., Mandrup, S., MacDougald, O.A., Geiman, D.E. and Lane, M.D. (1996) Transcriptional activation of the mouse obese (ob) gene by CCAAT/enhancer binding protein alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 873-877.

- Ikonen, E. (2006) Mechanisms for cellular cholesterol transport: defects and human disease. *Physiol Rev*, **86**, 1237-1261.
- Incardona, J.P. and Eaton, S. (2000) Cholesterol in signal transduction. *Curr Opin Cell Biol*, **12**, 193-203.
- Ingham, P.W. (2001) Hedgehog signaling: a tale of two lipids. *Science*, **294**, 1879-1881.
- Innocente, S.A. and Lee, J.M. (2005) p73 is a p53-independent, Sp1-dependent repressor of cyclin B1 transcription. *Biochem Biophys Res Commun*, **329**, 713-718.
- Insel, P.A., Head, B.P., Patel, H.H., Roth, D.M., Bunday, R.A. and Swaney, J.S. (2005) Compartmentation of G-protein-coupled receptors and their signalling components in lipid rafts and caveolae. *Biochem Soc Trans*, **33**, 1131-1134.
- Ipsen, J.H., Karlstrom, G., Mouritsen, O.G., Wennerstrom, H. and Zuckermann, M.J. (1987) Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. *Biochim Biophys Acta*, **905**, 162-172.
- Ipsen, J.H., Mouritsen, O.G. and Zuckermann, M.J. (1989) Theory of thermal anomalies in the specific heat of lipid bilayers containing cholesterol. *Biophys J*, **56**, 661-667.
- Irie, T., Fukunaga, K. and Pitha, J. (1992) Hydroxypropylcyclodextrins in parenteral use. I: Lipid dissolution and effects on lipid transfers in vitro. *J Pharm Sci*, **81**, 521-523.
- Irons, M., Elias, E.R., Salen, G., Tint, G.S. and Batta, A.K. (1993) Defective cholesterol biosynthesis in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Lancet*, **341**, 1414.
- Issemann, I. and Green, S. (1990) Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*, **347**, 645-650.
- Ito, M. (2000) Factors controlling cyclin B expression. *Plant Mol Biol*, **43**, 677-690.
- Janes, P.W., Ley, S.C. and Magee, A.I. (1999) Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor. *J Cell Biol*, **147**, 447-461.
- Janowski, B.A., Willy, P.J., Devi, T.R., Falck, J.R. and Mangelsdorf, D.J. (1996) An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature*, **383**, 728-731.
- Jansen, M., Pietiainen, V.M., Polonen, H., Rasilainen, L., Koivusalo, M., Ruotsalainen, U., Jokitalo, E. and Ikonen, E. (2008) Cholesterol substitution increases the structural heterogeneity of caveolae. *J Biol Chem*, **283**, 14610-14618.
- Jensen, C.B., Martin-Gronert, M.S., Storgaard, H., Madsbad, S., Vaag, A. and Ozanne, S.E. (2008) Altered PI3-kinase/Akt signalling in skeletal muscle of young men with low birth weight. *PLoS ONE*, **3**, e3738.
- Jiang, M.S. and Lane, M.D. (2000) Sequential repression and activation of the CCAAT enhancer-binding protein-alpha (C/EBPalpha) gene during adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 12519-12523.
- Jung, H.S., Kim, K.S., Chung, Y.J., Chung, H.K., Min, Y.K., Lee, M.S., Lee, M.K., Kim, K.W. and Chung, J.H. (2007) USF inhibits cell proliferation through delay in G2/M phase in FRTL-5 cells. *Endocr J*, **54**, 275-285.
- Juvet, L.K., Andresen, S.M., Schuster, G.U., Dalen, K.T., Tobin, K.A., Hollung, K., Haugen, F., Jacinto, S., Ulven, S.M., Bamberg, K., Gustafsson, J.A. and Nebb, H.I. (2003) On the role of liver X receptors in lipid accumulation in adipocytes. *Mol Endocrinol*, **17**, 172-182.
- Kabbani, N. and Levenson, R. (2006) Antipsychotic-induced alterations in D2 dopamine receptor interacting proteins within the cortex. *Neuroreport*, **17**, 299-301.
- Kabouridis, P.S., Janzen, J., Magee, A.L. and Ley, S.C. (2000) Cholesterol depletion disrupts lipid rafts and modulates the activity of multiple signaling pathways in T lymphocytes. *Eur J Immunol*, **30**, 954-963.
- Kaestner, K.H., Christy, R.J. and Lane, M.D. (1990) Mouse insulin-responsive glucose transporter gene: characterization of the gene and trans-activation by the CCAAT/enhancer binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 251-255.
- Kaneko, M., Sato, K., Horikoshi, R., Yaginuma, M., Yaginuma, N., Shiragata, M. and Kumashiro, H. (1992) Effect of haloperidol on cyclic AMP and inositol trisphosphate in rat striatum in vivo. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **46**, 53-57.
- Kaplan, G.B., Leite-Morris, K.A. and Keith, D.J. (1999) Differential effects of treatment with typical and atypical antipsychotic drugs on adenylyl cyclase and G proteins. *Neurosci Lett*, **273**, 147-150.
- Karlsson, M., Thorn, H., Danielsson, A., Stenkula, K.G., Ost, A., Gustavsson, J., Nystrom, F.H. and Stralfors, P. (2004) Colocalization of insulin receptor and insulin receptor substrate-1 to caveolae in primary human adipocytes. Cholesterol depletion blocks insulin signalling for metabolic and mitogenic control. *Eur J Biochem*, **271**, 2471-2479.

- Kato, M.M. and Goodnick, P.J. (2001) Antipsychotic medication: effects on regulation of glucose and lipids. *Expert Opin Pharmacother*, **2**, 1571-1582.
- Kato, Y., Ozaki, N., Yamada, T., Miura, Y. and Oiso, Y. (2007) H-89 potentiates adipogenesis in 3T3-L1 cells by activating insulin signaling independently of protein kinase A. *Life Sci*, **80**, 476-483.
- Katula, K.S., Wright, K.L., Paul, H., Surman, D.R., Nuckolls, F.J., Smith, J.W., Ting, J.P., Yates, J. and Cogswell, J.P. (1997) Cyclin-dependent kinase activation and S-phase induction of the cyclin B1 gene are linked through the CCAAT elements. *Cell Growth Differ*, **8**, 811-820.
- Katz, M., Amit, I. and Yarden, Y. (2007) Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta*, **1773**, 1161-1176.
- Keller, R.K., Arnold, T.P. and Fliesler, S.J. (2004) Formation of 7-dehydrocholesterol-containing membrane rafts in vitro and in vivo, with relevance to the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Lipid Res*, **45**, 347-355.
- Kelley, R.I. and Hennekam, R.C. (2000) The Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Med Genet*, **37**, 321-335.
- Kelley, R.I., Kratz, L.E., Glaser, R.L., Netzloff, M.L., Wolf, L.M. and Jabs, E.W. (2002) Abnormal sterol metabolism in a patient with Antley-Bixler syndrome and ambiguous genitalia. *Am J Med Genet*, **110**, 95-102.
- Kelley, R.I., Kratz, L.E. and Wilcox, W.G. (2000) Abnormal metabolism of 14-dehydrosterols in hypsoplastic ectopic calcification-moth-eaten skeletal dysplasia: evidence for new defect of cholesterol biosynthesis. *Proc. Greenwood Genet. Center*, **20**.
- Kelley, R.I., Wilcox, W.G., Smith, M., Kratz, L.E., Moser, A. and Rimoin, D.S. (1999) Abnormal sterol metabolism in patients with Conradi-Hunermann-Happle syndrome and sporadic lethal chondrodysplasia punctata. *Am J Med Genet*, **83**, 213-219.
- Kim, J.B. and Spiegelman, B.M. (1996) ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev*, **10**, 1096-1107.
- Kim, J.B., Wright, H.M., Wright, M. and Spiegelman, B.M. (1998) ADD1/SREBP1 activates PPARgamma through the production of endogenous ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 4333-4337.
- Kim, Y.K., Choi, H.Y., Kim, N.H., Lee, W., Seo, D.W., Kang, D.W., Lee, H.Y., Han, J.W., Park, S.W. and Kim, S.N. (2007) Reversine stimulates adipocyte differentiation and downregulates Akt and p70(s6k) signaling pathways in 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **358**, 553-558.
- Kimura, A., Mora, S., Shigematsu, S., Pessin, J.E. and Saltiel, A.R. (2002) The insulin receptor catalyzes the tyrosine phosphorylation of caveolin-1. *J Biol Chem*, **277**, 30153-30158.
- Kirsch, C., Eckert, G.P. and Mueller, W.E. (2003) Statin effects on cholesterol micro-domains in brain plasma membranes. *Biochem Pharmacol*, **65**, 843-856.
- Klemm, D.J., Roesler, W.J., Boras, T., Colton, L.A., Felder, K. and Reusch, J.E. (1998) Insulin stimulates cAMP-response element binding protein activity in HepG2 and 3T3-L1 cell lines. *J Biol Chem*, **273**, 917-923.
- Kliwer, S.A., Lenhard, J.M., Willson, T.M., Patel, I., Morris, D.C. and Lehmann, J.M. (1995) A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell*, **83**, 813-819.
- Kornhuber, J., Schultz, A., Wiltfang, J., Meineke, I., Gleiter, C.H., Zochling, R., Boissl, K.W., Leblhuber, F. and Riederer, P. (1999) Persistence of haloperidol in human brain tissue. *Am J Psychiatry*, **156**, 885-890.
- Kornhuber, J., Wiltfang, J., Riederer, P. and Bleich, S. (2006) Neuroleptic drugs in the human brain: clinical impact of persistence and region-specific distribution. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, **256**, 274-280.
- Korpi E.R., K.J.E., Costakos D.T., Linnoila M. and Wyatt R.J. (1984) Reduced haloperidol in the post-mortem brains of haloperidol-treated patients. *Psychiatry Res.*, **Psychiatry Res.**, 259-269.
- Kovarova, M., Wassif, C.A., Odom, S., Liao, K., Porter, F.D. and Rivera, J. (2006) Cholesterol deficiency in a mouse model of Smith-Lemli-Opitz syndrome reveals increased mast cell responsiveness. *J Exp Med*, **203**, 1161-1171.
- Kovbasnjuk, O., Edidin, M. and Donowitz, M. (2001) Role of lipid rafts in Shiga toxin 1 interaction with the apical surface of Caco-2 cells. *J Cell Sci*, **114**, 4025-4031.

- Kraml, M., Bagli, J.F. and Dvornik, D. (1964) Inhibition of the conversion of 7-dehydrocholesterol to cholesterol by AY-9944. *Biochem Biophys Res Commun*, **15**, 455-457.
- Krause, B.R. and Hartman, A.D. (1984) Adipose tissue and cholesterol metabolism. *J Lipid Res*, **25**, 97-110.
- Krisch, B., Feindt, J. and Mentlein, R. (1998) Immunoelectronmicroscopic analysis of the ligand-induced internalization of the somatostatin receptor subtype 2 in cultured human glioma cells. *J Histochem Cytochem*, **46**, 1233-1242.
- Kuri-Harcuch, W. and Marsch-Moreno, M. (1983) DNA synthesis and cell division related to adipose differentiation of 3T3 cells. *J Cell Physiol*, **114**, 39-44.
- Lange, Y. and Steck, T.L. (1994) Cholesterol homeostasis. Modulation by amphiphiles. *J Biol Chem*, **269**, 29371-29374.
- Lange, Y., Swaisgood, M.H., Ramos, B.V. and Steck, T.L. (1989) Plasma membranes contain half the phospholipid and 90% of the cholesterol and sphingomyelin in cultured human fibroblasts. *J Biol Chem*, **264**, 3786-3793.
- Larbi, A., Douziech, N., Khalil, A., Dupuis, G., Gherairi, S., Guerard, K.P. and Fulop, T., Jr. (2004) Effects of methyl-beta-cyclodextrin on T lymphocytes lipid rafts with aging. *Exp Gerontol*, **39**, 551-558.
- Le Lay, S., Krief, S., Farnier, C., Lefrere, I., Le Liepvre, X., Bazin, R., Ferre, P. and Dugail, I. (2001) Cholesterol, a cell size-dependent signal that regulates glucose metabolism and gene expression in adipocytes. *J Biol Chem*, **276**, 16904-16910.
- Ledo Trujillo, B. (2005) Papel del colesterol en la progresión del ciclo celular y vías de señalización implicadas.
- Lehmann, J.M., Moore, L.B., Smith-Oliver, T.A., Wilkison, W.O., Willson, T.M. and Kliewer, S.A. (1995) An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem*, **270**, 12953-12956.
- Levine, T. (2004) SSD: sterol-sensing direct. *Dev Cell*, **7**, 152-153.
- Lew, D.J. and Kornbluth, S. (1996) Regulatory roles of cyclin dependent kinase phosphorylation in cell cycle control. *Curr Opin Cell Biol*, **8**, 795-804.
- Li, A.C. and Glass, C.K. (2004) PPAR- and LXR-dependent pathways controlling lipid metabolism and the development of atherosclerosis. *J Lipid Res*, **45**, 2161-2173.
- Li, H., Goswami, P.C. and Domann, F.E. (2006) AP-2gamma induces p21 expression, arrests cell cycle, and inhibits the tumor growth of human carcinoma cells. *Neoplasia*, **8**, 568-577.
- Li, X., Cui, Q., Kao, C., Wang, G.J. and Balian, G. (2003) Lovastatin inhibits adipogenic and stimulates osteogenic differentiation by suppressing PPARgamma2 and increasing Cbfa1/Runx2 expression in bone marrow mesenchymal cell cultures. *Bone*, **33**, 652-659.
- Lim, H.K., Kang, H.K., Yoo, E.S., Kim, B.J., Kim, Y.W., Cho, M., Lee, J.H., Lee, Y.S., Chung, M.H. and Hyun, J.W. (2003) Oxysterols induce apoptosis and accumulation of cell cycle at G(2)/M phase in the human monocytic THP-1 cell line. *Life Sci*, **72**, 1389-1399.
- Lin, D.S., Connor, W.E., Wolf, D.P., Neuringer, M. and Hachey, D.L. (1993) Unique lipids of primate spermatozoa: desmosterol and docosahexaenoic acid. *J Lipid Res*, **34**, 491-499.
- Lin, E.J., Lee, N.J., Slack, K., Karl, T., Duffy, L., O'Brien, E., Matsumoto, I., Dedova, I., Herzog, H. and Sainsbury, A. (2006) Distinct endocrine effects of chronic haloperidol or risperidone administration in male rats. *Neuropharmacology*, **51**, 1129-1136.
- Lin, F.T. and Lane, M.D. (1992) Antisense CCAAT/enhancer-binding protein RNA suppresses coordinate gene expression and triglyceride accumulation during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Genes Dev*, **6**, 533-544.
- Lin, F.T. and Lane, M.D. (1994) CCAAT/enhancer binding protein alpha is sufficient to initiate the 3T3-L1 adipocyte differentiation program. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 8757-8761.
- Liu, X.Y., Dangel, A.W., Kelley, R.I., Zhao, W., Denny, P., Botcherby, M., Cattanaich, B., Peters, J., Hunsicker, P.R., Mallon, A.M., Strivens, M.A., Bate, R., Miller, W., Rhodes, M., Brown, S.D. and Herman, G.E. (1999) The gene mutated in bare patches and striated mice encodes a novel 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Nat Genet*, **22**, 182-187.
- Lopez, J.M., Bennett, M.K., Sanchez, H.B., Rosenfeld, J.M. and Osborne, T.F. (1996) Sterol regulation of acetyl coenzyme A carboxylase: a mechanism for coordinate control of cellular lipid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 1049-1053.

- Lu, T.T., Repa, J.J. and Mangelsdorf, D.J. (2001) Orphan nuclear receptors as eLiXIRs and FiXeRs of sterol metabolism. *J Biol Chem*, **276**, 37735-37738.
- Lu, X., Kambe, F., Cao, X., Yamauchi, M. and Seo, H. (2008) Insulin-like growth factor-I activation of Akt survival cascade in neuronal cells requires the presence of its cognate receptor in caveolae. *Exp Cell Res*, **314**, 342-351.
- Lu, X., Kambe, F., Cao, X., Yoshida, T., Ohmori, S., Murakami, K., Kaji, T., Ishii, T., Zadworny, D. and Seo, H. (2006) DHCR24-knockout embryonic fibroblasts are susceptible to serum withdrawal-induced apoptosis because of dysfunction of caveolae and insulin-Akt-Bad signaling. *Endocrinology*, **147**, 3123-3132.
- Luo, X. and Sawadogo, M. (1996) Functional domains of the transcription factor USF2: atypical nuclear localization signals and context-dependent transcriptional activation domains. *Mol Cell Biol*, **16**, 1367-1375.
- MacDougald, O.A. and Lane, M.D. (1995) Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu Rev Biochem*, **64**, 345-373.
- Magun, R., Burgering, B.M., Coffey, P.J., Pardasani, D., Lin, Y., Chabot, J. and Sorisky, A. (1996) Expression of a constitutively activated form of protein kinase B (c-Akt) in 3T3-L1 preadipose cells causes spontaneous differentiation. *Endocrinology*, **137**, 3590-3593.
- Mandrup, S. and Lane, M.D. (1997) Regulating adipogenesis. *J Biol Chem*, **272**, 5367-5370.
- Manni, I., Mazzaro, G., Gurtner, A., Mantovani, R., Haugwitz, U., Krause, K., Engeland, K., Sacchi, A., Soddu, S. and Piaggio, G. (2001) NF-Y mediates the transcriptional inhibition of the cyclin B1, cyclin B2, and cdc25C promoters upon induced G2 arrest. *J Biol Chem*, **276**, 5570-5576.
- Maron, D.J., Fazio, S. and Linton, M.F. (2000) Current perspectives on statins. *Circulation*, **101**, 207-213.
- Martinez-Botas, J., Ferruelo, A.J., Suarez, Y., Fernandez, C., Gomez-Coronado, D. and Lasuncion, M.A. (2001) Dose-dependent effects of lovastatin on cell cycle progression. Distinct requirement of cholesterol and non-sterol mevalonate derivatives. *Biochim Biophys Acta*, **1532**, 185-194.
- Martinez-Botas, J., Suarez, Y., Ferruelo, A.J., Gomez-Coronado, D. and Lasuncion, M.A. (1999) Cholesterol starvation decreases p34(cdc2) kinase activity and arrests the cell cycle at G2. *Faseb J*, **13**, 1359-1370.
- Mauch, D.H., Nagler, K., Schumacher, S., Goritz, C., Muller, E.C., Otto, A. and Pfrieder, F.W. (2001) CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science*, **294**, 1354-1357.
- Mausser, W., Perwitz, N., Meier, B., Fasshauer, M. and Klein, J. (2007) Direct adipotropic actions of atorvastatin: differentiation state-dependent induction of apoptosis, modulation of endocrine function, and inhibition of glucose uptake. *Eur J Pharmacol*, **564**, 37-46.
- Mayer, R.J., Adams, J.L., Bossard, M.J. and Berkhout, T.A. (1991) Effects of a novel lanosterol 14 alpha-demethylase inhibitor on the regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in Hep G2 cells. *J Biol Chem*, **266**, 20070-20078.
- McKeon, C. and Pham, T. (1991) Transactivation of the human insulin receptor gene by the CAAT/enhancer binding protein. *Biochem Biophys Res Commun*, **174**, 721-728.
- Megha, Bakht, O. and London, E. (2006) Cholesterol precursors stabilize ordinary and ceramide-rich ordered lipid domains (lipid rafts) to different degrees. Implications for the Bloch hypothesis and sterol biosynthesis disorders. *J Biol Chem*, **281**, 21903-21913.
- Meller, E. and Bohmker, K. (1996) Chronic treatment with antipsychotic drugs does not alter G protein alpha or beta subunit levels in rat brain. *Neuropharmacology*, **35**, 1785-1791.
- Mentlein, R., Held-Feindt, J. and Krisch, B. (2001) Topology of the signal transduction of the G protein-coupled somatostatin receptor sst2 in human glioma cells. *Cell Tissue Res*, **303**, 27-34.
- Meyer, J.M. and Koro, C.E. (2004) The effects of antipsychotic therapy on serum lipids: a comprehensive review. *Schizophr Res*, **70**, 1-17.
- Miao, L., Nielsen, M., Thewalt, J., Ipsen, J.H., Bloom, M., Zuckermann, M.J. and Mouritsen, O.G. (2002) From lanosterol to cholesterol: structural evolution and differential effects on lipid bilayers. *Biophys J*, **82**, 1429-1444.
- Miller, C.W. and Ntambi, J.M. (1996) Peroxisome proliferators induce mouse liver stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 9443-9448.
- Miyamoto, S., Duncan, G.E., Marx, C.E. and Lieberman, J.A. (2005) Treatments for schizophrenia: a critical review of pharmacology and mechanisms of action of antipsychotic drugs. *Mol Psychiatry*, **10**, 79-104.

- Moebius, F.F., Bermoser, K., Reiter, R.J., Hanner, M. and Glossmann, H. (1996) Yeast sterol C8-C7 isomerase: identification and characterization of a high-affinity binding site for enzyme inhibitors. *Biochemistry*, **35**, 16871-16878.
- Moebius, F.F., Striessnig, J. and Glossmann, H. (1997) The mysteries of sigma receptors: new family members reveal a role in cholesterol synthesis. *Trends Pharmacol Sci*, **18**, 67-70.
- Moffett, S., Brown, D.A. and Linder, M.E. (2000) Lipid-dependent targeting of G proteins into rafts. *J Biol Chem*, **275**, 2191-2198.
- Mokdad, A.H., Bowman, B.A., Ford, E.S., Vinicor, F., Marks, J.S. and Koplan, J.P. (2001) The continuing epidemics of obesity and diabetes in the United States. *Jama*, **286**, 1195-1200.
- Moller, L.N., Stidsen, C.E., Hartmann, B. and Holst, J.J. (2003) Somatostatin receptors. *Biochim Biophys Acta*, **1616**, 1-84.
- Mouritsen, O.G. and Zuckermann, M.J. (2004) What's so special about cholesterol? *Lipids*, **39**, 1101-1113.
- Munro, S. (2003) Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell*, **115**, 377-388.
- Murata, M., Peranen, J., Schreiner, R., Wieland, F., Kurzchalia, T.V. and Simons, K. (1995) VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 10339-10343.
- Murata, T., Maruoka, N., Omata, N., Takashima, Y., Igarashi, K., Kasuya, F., Fujibayashi, Y. and Wada, Y. (2007) Effects of haloperidol and its pyridinium metabolite on plasma membrane permeability and fluidity in the rat brain. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, **31**, 848-857.
- Mutka, A.L., Lusa, S., Linder, M.D., Jokitalo, E., Kopra, O., Jauhiainen, M. and Ikonen, E. (2004) Secretion of sterols and the NPC2 protein from primary astrocytes. *J Biol Chem*, **279**, 48654-48662.
- Nakata, M., Nagasaka, S., Kusaka, I., Matsuoka, H., Ishibashi, S. and Yada, T. (2006) Effects of statins on the adipocyte maturation and expression of glucose transporter 4 (SLC2A4): implications in glycaemic control. *Diabetologia*, **49**, 1881-1892.
- Narce, M. and Poisson, J.P. (2004) Lipid metabolism: is liver X receptor (LXR) a regulator of adipocyte differentiation? Consequences of stearoyl-CoA desaturase activation by LXR. *Curr Opin Lipidol*, **15**, 703-706.
- Naslavsky, N., Stein, R., Yanai, A., Friedlander, G. and Taraboulos, A. (1997) Characterization of detergent-insoluble complexes containing the cellular prion protein and its scrapie isoform. *J Biol Chem*, **272**, 6324-6331.
- Nicholson, A.C., Hajjar, D.P., Zhou, X., He, W., Gotto, A.M., Jr. and Han, J. (2007) Anti-adipogenic action of pitavastatin occurs through the coordinate regulation of PPARgamma and Pref-1 expression. *Br J Pharmacol*, **151**, 807-815.
- Nishio, E., Tomiyama, K., Nakata, H. and Watanabe, Y. (1996) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor impairs cell differentiation in cultured adipogenic cells (3T3-L1). *Eur J Pharmacol*, **301**, 203-206.
- Nottoli, T., Hagopian-Donaldson, S., Zhang, J., Perkins, A. and Williams, T. (1998) AP-2-null cells disrupt morphogenesis of the eye, face, and limbs in chimeric mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 13714-13719.
- Nystrom, F.H., Chen, H., Cong, L.N., Li, Y. and Quon, M.J. (1999) Caveolin-1 interacts with the insulin receptor and can differentially modulate insulin signaling in transfected Cos-7 cells and rat adipose cells. *Mol Endocrinol*, **13**, 2013-2024.
- Ohira, K., Maekawa, S. and Hayashi, M. (2000) Absence of TrkB and insulin receptor beta in the Triton insoluble low-density fraction (raft). *Neuroreport*, **11**, 1307-1311.
- Ohtani, Y., Irie, T., Uekama, K., Fukunaga, K. and Pitha, J. (1989) Differential effects of alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins on human erythrocytes. *Eur J Biochem*, **186**, 17-22.
- Ohvo-Rekila, H., Ramstedt, B., Leppimaki, P. and Slotte, J.P. (2002) Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Prog Lipid Res*, **41**, 66-97.
- Okamoto, T., Schlegel, A., Scherer, P.E. and Lisanti, M.P. (1998) Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J Biol Chem*, **273**, 5419-5422.
- Otto, T.C. and Lane, M.D. (2005) Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **40**, 229-242.
- Owicki, J.C. and McConnell, H.M. (1980) Lateral diffusion in inhomogeneous membranes. Model membranes containing cholesterol. *Biophys J*, **30**, 383-397.

- Pages, G., Guerin, S., Grall, D., Bonino, F., Smith, A., Anjuere, F., Auberger, P. and Poussegur, J. (1999) Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science*, **286**, 1374-1377.
- Parpal, S., Karlsson, M., Thorn, H. and Strafors, P. (2001) Cholesterol depletion disrupts caveolae and insulin receptor signaling for metabolic control via insulin receptor substrate-1, but not for mitogen-activated protein kinase control. *J Biol Chem*, **276**, 9670-9678.
- Paul, R., Silve, S., De Nys, N., Dupuy, P.H., Bouteiller, C.L., Rosenfeld, J., Ferrara, P., Le Fur, G., Casellas, P. and Loison, G. (1998) Both the immunosuppressant SR31747 and the antiestrogen tamoxifen bind to an emopamil-insensitive site of mammalian Delta8-Delta7 sterol isomerase. *J Pharmacol Exp Ther*, **285**, 1296-1302.
- Pawson, T. (2004) Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell*, **116**, 191-203.
- Peet, D.J., Janowski, B.A. and Mangelsdorf, D.J. (1998a) The LXRs: a new class of oxysterol receptors. *Curr Opin Genet Dev*, **8**, 571-575.
- Peet, D.J., Turley, S.D., Ma, W., Janowski, B.A., Lobaccaro, J.M., Hammer, R.E. and Mangelsdorf, D.J. (1998b) Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell*, **93**, 693-704.
- Peng, X.D., Xu, P.Z., Chen, M.L., Hahn-Windgassen, A., Skeen, J., Jacobs, J., Sundararajan, D., Chen, W.S., Crawford, S.E., Coleman, K.G. and Hay, N. (2003) Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. *Genes Dev*, **17**, 1352-1365.
- Peres, C., Yart, A., Perret, B., Salles, J.P. and Raynal, P. (2003) Modulation of phosphoinositide 3-kinase activation by cholesterol level suggests a novel positive role for lipid rafts in lysophosphatidic acid signalling. *FEBS Lett*, **534**, 164-168.
- Perez-Iglesias, R., Crespo-Facorro, B., Amado, J.A., Garcia-Unzueta, M.T., Ramirez-Bonilla, M.L., Gonzalez-Blanch, C., Martinez-Garcia, O. and Vazquez-Barquero, J.L. (2007) A 12-week randomized clinical trial to evaluate metabolic changes in drug-naive, first-episode psychosis patients treated with haloperidol, olanzapine, or risperidone. *J Clin Psychiatry*, **68**, 1733-1740.
- Perez-Iglesias R, M.I., Pelayo-Teran JM, Amado JA, Garcia-Unzueta MT, Berja A, Martinez-Garcia O, Vazquez-Barquero JL, Crespo-Facorro B. (2009) Glucose and lipid disturbances after 1 year of antipsychotic treatment in a drug-naïve population. *Schizophr Res*, **107**, 115-121.
- Perez-Oso, E., Colas, B., Lopez-Ruiz, M.P. and Arilla, E. (1989) Long-term haloperidol treatment decreases somatostatin binding in rat brain. *Neuropeptides*, **13**, 157-163.
- Perez-Oso, E., Lopez-Ruiz, M.P. and Arilla, E. (1990) Effect of haloperidol withdrawal on somatostatin level and binding in rat brain. *Biosci Rep*, **10**, 15-22.
- Persaud-Sawin, D.A., Lightcap, S. and Harry, G.J. (2008) Isolation of rafts from mouse brain tissue using a detergent-free method. *J Lipid Res*.
- Peters, C., Wolf, A., Wagner, M., Kuhlmann, J. and Waldmann, H. (2004) The cholesterol membrane anchor of the Hedgehog protein confers stable membrane association to lipid-modified proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 8531-8536.
- Pfriege, F.W. (2003) Cholesterol homeostasis and function in neurons of the central nervous system. *Cell Mol Life Sci*, **60**, 1158-1171.
- Piaggio, G., Farina, A., Perrotti, D., Manni, I., Fuschi, P., Sacchi, A. and Gaetano, C. (1995) Structure and growth-dependent regulation of the human cyclin B1 promoter. *Exp Cell Res*, **216**, 396-402.
- Pike, L.J. (2003) Lipid rafts: bringing order to chaos. *J Lipid Res*, **44**, 655-667.
- Pike, L.J. (2004) Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochem J*, **378**, 281-292.
- Pike, L.J. (2006) Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res*, **47**, 1597-1598.
- Pines, J. (1995) Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochem J*, **308 (Pt 3)**, 697-711.
- Pines, J. and Hunter, T. (1990) p34cdc2: the S and M kinase? *New Biol*, **2**, 389-401.
- Piwiń-Pilipuk, G., Van Mater, D., Ross, S.E., MacDougald, O.A. and Schwartz, J. (2001) Growth hormone regulates phosphorylation and function of CCAAT/enhancer-binding protein beta by modulating Akt and glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem*, **276**, 19664-19671.

- Plum, L., Schubert, M. and Bruning, J.C. (2005) The role of insulin receptor signaling in the brain. *Trends Endocrinol Metab*, **16**, 59-65.
- Pohl, J., Ring, A., Eehalt, R., Schulze-Bergkamen, H., Schad, A., Verkade, P. and Stremmel, W. (2004) Long-chain fatty acid uptake into adipocytes depends on lipid raft function. *Biochemistry*, **43**, 4179-4187.
- Ponce, J., de la Ossa, N.P., Hurtado, O., Millan, M., Arenillas, J.F., Davalos, A. and Gasull, T. (2008) Simvastatin reduces the association of NMDA receptors to lipid rafts: a cholesterol-mediated effect in neuroprotection. *Stroke*, **39**, 1269-1275.
- Porter, F.D. (2000) RSH/Smith-Lemli-Opitz syndrome: a multiple congenital anomaly/mental retardation syndrome due to an inborn error of cholesterol biosynthesis. *Mol Genet Metab*, **71**, 163-174.
- Prinetti, A., Chigorno, V., Tettamanti, G. and Sonnino, S. (2000) Sphingolipid-enriched membrane domains from rat cerebellar granule cells differentiated in culture. A compositional study. *J Biol Chem*, **275**, 11658-11665.
- Prusty, D., Park, B.H., Davis, K.E. and Farmer, S.R. (2002) Activation of MEK/ERK signaling promotes adipogenesis by enhancing peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and C/EBPalpha gene expression during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem*, **277**, 46226-46232.
- Radhakrishnan, A., Sun, L.P., Kwon, H.J., Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (2004) Direct binding of cholesterol to the purified membrane region of SCAP: mechanism for a sterol-sensing domain. *Mol Cell*, **15**, 259-268.
- Raeder, M.B., Ferno, J., Vik-Mo, A.O. and Steen, V.M. (2006) SREBP activation by antipsychotic- and antidepressant-drugs in cultured human liver cells: relevance for metabolic side-effects? *Mol Cell Biochem*, **289**, 167-173.
- Ramstedt, B. and Slotte, J.P. (2002) Membrane properties of sphingomyelins. *FEBS Lett*, **531**, 33-37.
- Reichert, M. and Eick, D. (1999) Analysis of cell cycle arrest in adipocyte differentiation. *Oncogene*, **18**, 459-466.
- Repa, J.J., Liang, G., Ou, J., Bashmakov, Y., Lobaccaro, J.M., Shimomura, I., Shan, B., Brown, M.S., Goldstein, J.L. and Mangelsdorf, D.J. (2000) Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRBeta. *Genes Dev*, **14**, 2819-2830.
- Rezek, M., Havlicek, V., Leybin, L., Pinsky, C., Kroeger, E.A., Hughes, K.R. and Friesen, H. (1977) Neostriatal administration of somatostatin: differential effect of small and large doses on behavior and motor control. *Can J Physiol Pharmacol*, **55**, 234-242.
- Ries, S., Buchler, C., Langmann, T., Fehringer, P., Aslanidis, C. and Schmitz, G. (1998) Transcriptional regulation of lysosomal acid lipase in differentiating monocytes is mediated by transcription factors Sp1 and AP-2. *J Lipid Res*, **39**, 2125-2134.
- Rodríguez-Acebes S, d.I.C.P., Fernández-Hernando C, Ferruelo AJ, Lasunción MA, Rawson RB, Martínez-Botas J, Gómez-Coronado D. (2009) Desmosterol can replace cholesterol in sustaining cell proliferation and regulating the SREBP pathway in a sterol-Delta24-reductase deficient cell line. *Biochem J*.
- Rog, T., Vattulainen, I., Jansen, M., Ikonen, E. and Karttunen, M. (2008) Comparison of cholesterol and its direct precursors along the biosynthetic pathway: effects of cholesterol, desmosterol and 7-dehydrocholesterol on saturated and unsaturated lipid bilayers. *J Chem Phys*, **129**, 154508.
- Ron, D. and Habener, J.F. (1992) CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev*, **6**, 439-453.
- Rosen, E.D., Hsu, C.H., Wang, X., Sakai, S., Freeman, M.W., Gonzalez, F.J. and Spiegelman, B.M. (2002) C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. *Genes Dev*, **16**, 22-26.
- Rosenbaum, M., Leibel, R.L. and Hirsch, J. (1997) Obesity. *N Engl J Med*, **337**, 396-407.
- Rothberg, K.G., Heuser, J.E., Donzell, W.C., Ying, Y.S., Glenney, J.R. and Anderson, R.G. (1992) Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell*, **68**, 673-682.
- Rothblat, G.H., Burns, C.H., Conner, R.L. and Landrey, J.R. (1970) Desmosterol as the major sterol in L-cell mouse fibroblasts grown in sterol-free culture medium. *Science*, **169**, 880-882.
- Ryan, M.C., Collins, P. and Thakore, J.H. (2003) Impaired fasting glucose tolerance in first-episode, drug-naive patients with schizophrenia. *Am J Psychiatry*, **160**, 284-289.

- Saba-El-Leil, M.K., Vella, F.D., Vernay, B., Voisin, L., Chen, L., Labrecque, N., Ang, S.L. and Meloche, S. (2003) An essential function of the mitogen-activated protein kinase Erk2 in mouse trophoblast development. *EMBO Rep*, **4**, 964-968.
- Sakai, J., Nohturfft, A., Cheng, D., Ho, Y.K., Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (1997) Identification of complexes between the COOH-terminal domains of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) and SREBP cleavage-activating protein. *J Biol Chem*, **272**, 20213-20221.
- Sakakura, Y., Shimano, H., Sone, H., Takahashi, A., Inoue, N., Toyoshima, H., Suzuki, S. and Yamada, N. (2001) Sterol regulatory element-binding proteins induce an entire pathway of cholesterol synthesis. *Biochem Biophys Res Commun*, **286**, 176-183.
- Sale, E.M., Atkinson, P.G. and Sale, G.J. (1995) Requirement of MAP kinase for differentiation of fibroblasts to adipocytes, for insulin activation of p90 S6 kinase and for insulin or serum stimulation of DNA synthesis. *Embo J*, **14**, 674-684.
- Salin, P., Kerkerian-Le Goff, L., Heidet, V., Epelbaum, J. and Nieoullon, A. (1990) Somatostatin-immunoreactive neurons in the rat striatum: effects of corticostriatal and nigrostriatal dopaminergic lesions. *Brain Res*, **521**, 23-32.
- Samuli Ollila, O.H., Rog, T., Karttunen, M. and Vattulainen, I. (2007) Role of sterol type on lateral pressure profiles of lipid membranes affecting membrane protein functionality: Comparison between cholesterol, desmosterol, 7-dehydrocholesterol and ketosterol. *J Struct Biol*, **159**, 311-323.
- Sanchez, H.B., Yieh, L. and Osborne, T.F. (1995) Cooperation by sterol regulatory element-binding protein and Sp1 in sterol regulation of low density lipoprotein receptor gene. *J Biol Chem*, **270**, 1161-1169.
- Sanchez-Martin, C.C., Davalos, A., Martin-Sanchez, C., de la Pena, G., Fernandez-Hernando, C. and Lasuncion, M.A. (2007) Cholesterol starvation induces differentiation of human leukemia HL-60 cells. *Cancer Res*, **67**, 3379-3386.
- Scatchard, G. (1949) Equilibrium in non-electrolyte mixtures. *Chem Rev*, **44**, 7-35.
- Scettini, G., Florio, T., Meucci, O., Landolfi, E., Grimaldi, M., Ventra, C. and Marino, A. (1989) Somatostatin inhibition of adenylate cyclase activity in different brain areas. *Brain Res*, **492**, 65-71.
- Schmitz, G. and Grandl, M. (2008) Update on lipid membrane microdomains. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, **11**, 106-112.
- Schoonjans, K., Watanabe, M., Suzuki, H., Mahfoudi, A., Krey, G., Wahli, W., Grimaldi, P., Staels, B., Yamamoto, T. and Auwerx, J. (1995) Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter. *J Biol Chem*, **270**, 19269-19276.
- Schubert, M., Gautam, D., Surjo, D., Ueki, K., Baudler, S., Schubert, D., Kondo, T., Alber, J., Galidiks, N., Kustermann, E., Arndt, S., Jacobs, A.H., Krone, W., Kahn, C.R. and Bruning, J.C. (2004) Role for neuronal insulin resistance in neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 3100-3105.
- Schuck, S., Honsho, M., Ekroos, K., Shevchenko, A. and Simons, K. (2003) Resistance of cell membranes to different detergents. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 5795-5800.
- Schultz, J.R., Tu, H., Luk, A., Repa, J.J., Medina, J.C., Li, L., Schwendner, S., Wang, S., Thoolen, M., Mangelsdorf, D.J., Lustig, K.D. and Shan, B. (2000) Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev*, **14**, 2831-2838.
- Schwencke, C., Braun-Dullaes, R.C., Wunderlich, C. and Strasser, R.H. (2006) Caveolae and caveolin in transmembrane signaling: Implications for human disease. *Cardiovasc Res*, **70**, 42-49.
- Seo, J.B., Moon, H.M., Kim, W.S., Lee, Y.S., Jeong, H.W., Yoo, E.J., Ham, J., Kang, H., Park, M.G., Steffensen, K.R., Stulnig, T.M., Gustafsson, J.A., Park, S.D. and Kim, J.B. (2004) Activated liver X receptors stimulate adipocyte differentiation through induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression. *Mol Cell Biol*, **24**, 3430-3444.
- Shao, D. and Lazar, M.A. (1997) Peroxisome proliferator activated receptor gamma, CCAAT/enhancer-binding protein alpha, and cell cycle status regulate the commitment to adipocyte differentiation. *J Biol Chem*, **272**, 21473-21478.
- Sharma, M.D., Garber, A.J. and Farmer, J.A. (2008) Role of insulin signaling in maintaining energy homeostasis. *Endocr Pract*, **14**, 373-380.

- Shin, C.J., Kim, Y.S., Park, J.B. and Juhn, Y.S. (1995) Changes in G protein levels in the hippocampus and the striatum of rat brain after chronic treatment with haloperidol and sulpiride. *Neuropharmacology*, **34**, 1335-1338.
- Silve, S., Dupuy, P.H., Labit-Lebouteiller, C., Kaghad, M., Chalon, P., Rahier, A., Taton, M., Lupker, J., Shire, D. and Loison, G. (1996) Emopamil-binding protein, a mammalian protein that binds a series of structurally diverse neuroprotective agents, exhibits delta8-delta7 sterol isomerase activity in yeast. *J Biol Chem*, **271**, 22434-22440.
- Silvius, J.R. (2003) Role of cholesterol in lipid raft formation: lessons from lipid model systems. *Biochim Biophys Acta*, **1610**, 174-183.
- Simons, K. and Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature*, **387**, 569-572.
- Simons, K. and Toomre, D. (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **1**, 31-39.
- Simons, K. and van Meer, G. (1988) Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry*, **27**, 6197-6202.
- Simpson, G.M., Cooper, T.B. and Braun, G.A. (1967) Further studies on the effect of butyrophenones on cholesterol synthesis in humans. *Curr Ther Res Clin Exp*, **9**, 413-418.
- Singer, S.J. and Nicolson, G.L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, **175**, 720-731.
- Smart, E.J., Ying, Y.S., Mineo, C. and Anderson, R.G. (1995) A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 10104-10108.
- Smith, L.M., Rubenstein, J.L., Parce, J.W. and McConnell, H.M. (1980) Lateral diffusion of M-13 coat protein in mixtures of phosphatidylcholine and cholesterol. *Biochemistry*, **19**, 5907-5911.
- Solomon, M.J., Glotzer, M., Lee, T.H., Philippe, M. and Kirschner, M.W. (1990) Cyclin activation of p34cdc2. *Cell*, **63**, 1013-1024.
- Song, C., Guo, Z., Ma, Q., Chen, Z., Liu, Z., Jia, H. and Dang, G. (2003) Simvastatin induces osteoblastic differentiation and inhibits adipocytic differentiation in mouse bone marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **308**, 458-462.
- Song, K.S., Li, S., Okamoto, T., Quilliam, L.A., Sargiacomo, M. and Lisanti, M.P. (1996) Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent-free purification of caveolae microdomains. *J Biol Chem*, **271**, 9690-9697.
- Souto, R.P., Vallega, G., Wharton, J., Vinten, J., Tranum-Jensen, J. and Pilch, P.F. (2003) Immunopurification and characterization of rat adipocyte caveolae suggest their dissociation from insulin signaling. *J Biol Chem*, **278**, 18321-18329.
- Spiegelman, B.M., Choy, L., Hotamisligil, G.S., Graves, R.A. and Tontonoz, P. (1993) Regulation of adipocyte gene expression in differentiation and syndromes of obesity/diabetes. *J Biol Chem*, **268**, 6823-6826.
- Stan, R.V. (2005) Structure of caveolae. *Biochim Biophys Acta*, **1746**, 334-348.
- Steffensen, K.R. and Gustafsson, J.A. (2004) Putative metabolic effects of the liver X receptor (LXR). *Diabetes*, **53 Suppl 1**, S36-42.
- Stoffel, W. and Bosio, A. (1997) Myelin glycolipids and their functions. *Curr Opin Neurobiol*, **7**, 654-661.
- Suarez, Y., Fernandez, C., Gomez-Coronado, D., Ferruelo, A.J., Davalos, A., Martinez-Botas, J. and Lasuncion, M.A. (2004) Synergistic upregulation of low-density lipoprotein receptor activity by tamoxifen and lovastatin. *Cardiovasc Res*, **64**, 346-355.
- Suarez, Y., Fernandez, C., Ledo, B., Ferruelo, A.J., Martin, M., Vega, M.A., Gomez-Coronado, D. and Lasuncion, M.A. (2002) Differential effects of ergosterol and cholesterol on Cdk1 activation and SRE-driven transcription. *Eur J Biochem*, **269**, 1761-1771.
- Suarez, Y., Fernandez, C., Ledo, B., Martin, M., Gomez-Coronado, D. and Lasuncion, M.A. (2005) Sterol stringency of proliferation and cell cycle progression in human cells. *Biochim Biophys Acta*, **1734**, 203-213.
- Sudhof, T.C., Van der Westhuyzen, D.R., Goldstein, J.L., Brown, M.S. and Russell, D.W. (1987) Three direct repeats and a TATA-like sequence are required for regulated expression of the human low density lipoprotein receptor gene. *J Biol Chem*, **262**, 10773-10779.
- Summerly, R., Yardley, H.J. (1965) The effect of a substituted fluorobutyrophenone (Haloperidol) on the metabolism of sterols in rat skin. *Biochem. J*, **96**, 30p.
- Suomalainen, M. (2002) Lipid rafts and assembly of enveloped viruses. *Traffic*, **3**, 705-709.

- Suzuki, S., Kiyosue, K., Hazama, S., Ogura, A., Kashihara, M., Hara, T., Koshimizu, H. and Kojima, M. (2007) Brain-derived neurotrophic factor regulates cholesterol metabolism for synapse development. *J Neurosci*, **27**, 6417-6427.
- Sweeney, G., Somwar, R., Ramlal, T., Volchuk, A., Ueyama, A. and Klip, A. (1999) An inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase prevents insulin-stimulated glucose transport but not glucose transporter translocation in 3T3-L1 adipocytes and L6 myotubes. *J Biol Chem*, **274**, 10071-10078.
- Tang, Q.Q., Gronborg, M., Huang, H., Kim, J.W., Otto, T.C., Pandey, A. and Lane, M.D. (2005) Sequential phosphorylation of CCAAT enhancer-binding protein beta by MAPK and glycogen synthase kinase 3beta is required for adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 9766-9771.
- Tang, Q.Q. and Lane, M.D. (1999) Activation and centromeric localization of CCAAT/enhancer-binding proteins during the mitotic clonal expansion of adipocyte differentiation. *Genes Dev*, **13**, 2231-2241.
- Tang, Q.Q. and Lane, M.D. (2000) Role of C/EBP homologous protein (CHOP-10) in the programmed activation of CCAAT/enhancer-binding protein-beta during adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 12446-12450.
- Tang, Q.Q., Otto, T.C. and Lane, M.D. (2003) CCAAT/enhancer-binding protein beta is required for mitotic clonal expansion during adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 850-855.
- Taniguchi, C.M., Emanuelli, B. and Kahn, C.R. (2006) Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 85-96.
- Tao, H. and Umek, R.M. (2000) C/EBPalpha is required to maintain postmitotic growth arrest in adipocytes. *DNA Cell Biol*, **19**, 9-18.
- Taton, M., Benveniste, P. and Rahier, A. (1989) Microsomal delta 8,14-sterol delta 14-reductase in higher plants. Characterization and inhibition by analogues of a presumptive carbocationic intermediate of the reduction reaction. *Eur J Biochem*, **185**, 605-614.
- Tessier, C., Nuss, P., Staneva, G. and Wolf, C. (2008) Modification of membrane heterogeneity by antipsychotic drugs: an X-ray diffraction comparative study. *J Colloid Interface Sci*, **320**, 469-475.
- Thorn, H., Stenkula, K.G., Karlsson, M., Ortegren, U., Nystrom, F.H., Gustavsson, J. and Stralfors, P. (2003) Cell surface orifices of caveolae and localization of caveolin to the necks of caveolae in adipocytes. *Mol Biol Cell*, **14**, 3967-3976.
- Timchenko, N., Wilson, D.R., Taylor, L.R., Abdelsayed, S., Wilde, M., Sawadogo, M. and Darlington, G.J. (1995) Autoregulation of the human C/EBP alpha gene by stimulation of upstream stimulatory factor binding. *Mol Cell Biol*, **15**, 1192-1202.
- Tint, G.S., Irons, M., Elias, E.R., Batta, A.K., Frieden, R., Chen, T.S. and Salen, G. (1994) Defective cholesterol biosynthesis associated with the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *N Engl J Med*, **330**, 107-113.
- Toki, S., Donati, R.J. and Rasenick, M.M. (1999) Treatment of C6 glioma cells and rats with antidepressant drugs increases the detergent extraction of G(s alpha) from plasma membrane. *J Neurochem*, **73**, 1114-1120.
- Tomiyama, K., Nakata, H., Sasa, H., Arimura, S., Nishio, E. and Watanabe, Y. (1995) Wortmannin, a specific phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, inhibits adipocytic differentiation of 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **212**, 263-269.
- Tomiyama, K., Nishio, E. and Watanabe, Y. (1999) Both wortmannin and simvastatin inhibit the adipogenesis in 3T3-L1 cells during the late phase of differentiation. *Jpn J Pharmacol*, **80**, 375-378.
- Tontonoz, P., Graves, R.A., Budavari, A.I., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Hu, E., Tempst, P. and Spiegelman, B.M. (1994a) Adipocyte-specific transcription factor ARF6 is a heterodimeric complex of two nuclear hormone receptors, PPAR gamma and RXR alpha. *Nucleic Acids Res*, **22**, 5628-5634.
- Tontonoz, P., Hu, E., Devine, J., Beale, E.G. and Spiegelman, B.M. (1995a) PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol Cell Biol*, **15**, 351-357.
- Tontonoz, P., Hu, E., Graves, R.A., Budavari, A.I. and Spiegelman, B.M. (1994b) mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev*, **8**, 1224-1234.
- Tontonoz, P., Hu, E. and Spiegelman, B.M. (1994c) Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*, **79**, 1147-1156.

- Tontonoz, P., Hu, E. and Spiegelman, B.M. (1995b) Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator activated receptor gamma. *Curr Opin Genet Dev*, **5**, 571-576.
- Tontonoz, P., Kim, J.B., Graves, R.A. and Spiegelman, B.M. (1993) ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation. *Mol Cell Biol*, **13**, 4753-4759.
- Trautwein, C., Caelles, C., van der Geer, P., Hunter, T., Karin, M. and Chojkier, M. (1993) Transactivation by NF-IL6/LAP is enhanced by phosphorylation of its activation domain. *Nature*, **364**, 544-547.
- Treisman, G.J., Muirhead, N. and Gnegy, M.E. (1986) Increased sensitivity of adenylate cyclase activity in the striatum of the rat to calmodulin and GppNHp after chronic treatment with haloperidol. *Neuropharmacology*, **25**, 587-595.
- Trembley, J.H., Chen, Z., Rodrigues, C.M., Kren, B.T. and Steer, C.J. (2000) Genomic organization and promoter characterization of the rat cyclin B1 gene. *Gene*, **255**, 93-104.
- Trembley, J.H., Kren, B.T. and Steer, C.J. (1994) Posttranscriptional regulation of cyclin B messenger RNA expression in the regenerating rat liver. *Cell Growth Differ*, **5**, 99-108.
- Tsui-Pierchala, B.A., Encinas, M., Milbrandt, J. and Johnson, E.M., Jr. (2002) Lipid rafts in neuronal signaling and function. *Trends Neurosci*, **25**, 412-417.
- Tuck, S.F., Patel, H., Safi, E. and Robinson, C.H. (1991) Lanosterol 14 alpha-demethylase (P45014DM): effects of P45014DM inhibitors on sterol biosynthesis downstream of lanosterol. *J Lipid Res*, **32**, 893-902.
- Tulenko, T.N., Boeze-Battaglia, K., Mason, R.P., Tint, G.S., Steiner, R.D., Connor, W.E. and Labelle, E.F. (2006) A membrane defect in the pathogenesis of the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Lipid Res*, **47**, 134-143.
- Tulipano, G. and Schulz, S. (2007) Novel insights in somatostatin receptor physiology. *Eur J Endocrinol*, **156 Suppl 1**, S3-11.
- Ukai, W., Ozawa, H., Tateno, M., Hashimoto, E. and Saito, T. (2004) Neurotoxic potential of haloperidol in comparison with risperidone: implication of Akt-mediated signal changes by haloperidol. *J Neural Transm*, **111**, 667-681.
- Ushio-Fukai, M., Hilenski, L., Santanam, N., Becker, P.L., Ma, Y., Griendling, K.K. and Alexander, R.W. (2001) Cholesterol depletion inhibits epidermal growth factor receptor transactivation by angiotensin II in vascular smooth muscle cells: role of cholesterol-rich microdomains and focal adhesions in angiotensin II signaling. *J Biol Chem*, **276**, 48269-48275.
- Vainio, S., Jansen, M., Koivusalo, M., Rog, T., Karttunen, M., Vattulainen, I. and Ikonen, E. (2006) Significance of sterol structural specificity. Desmosterol cannot replace cholesterol in lipid rafts. *J Biol Chem*, **281**, 348-355.
- van der Heide, L.P., Ramakers, G.M. and Smidt, M.P. (2006) Insulin signaling in the central nervous system: learning to survive. *Prog Neurobiol*, **79**, 205-221.
- van Meer, G. (1989) Lipid traffic in animal cells. *Annu Rev Cell Biol*, **5**, 247-275.
- Vestri, H.S., Maianu, L., Moellering, D.R. and Garvey, W.T. (2007) Atypical antipsychotic drugs directly impair insulin action in adipocytes: effects on glucose transport, lipogenesis, and antilipolysis. *Neuropsychopharmacology*, **32**, 765-772.
- Viollet, C., Vaillend, C., Videau, C., Bluet-Pajot, M.T., Ungerer, A., L'Heritier, A., Kopp, C., Potier, B., Billard, J., Schaeffer, J., Smith, R.G., Rohrer, S.P., Wilkinson, H., Zheng, H. and Epelbaum, J. (2000) Involvement of sst2 somatostatin receptor in locomotor, exploratory activity and emotional reactivity in mice. *Eur J Neurosci*, **12**, 3761-3770.
- Watts, V.J. and Neve, K.A. (2005) Sensitization of adenylate cyclase by Galpha *i/o*-coupled receptors. *Pharmacol Ther*, **106**, 405-421.
- Wechsler, A., Brafman, A., Shafir, M., Heverin, M., Gottlieb, H., Damari, G., Gozlan-Kelner, S., Spivak, I., Moshkin, O., Fridman, E., Becker, Y., Skaliter, R., Einat, P., Faerman, A., Bjorkhem, I. and Feinstein, E. (2003) Generation of viable cholesterol-free mice. *Science*, **302**, 2087.
- Whetton, A.D., Gordon, L.M. and Houslay, M.D. (1983) Adenylate cyclase is inhibited upon depletion of plasma-membrane cholesterol. *Biochem J*, **212**, 331-338.
- White, M.F. and Kahn, C.R. (1994) The insulin signaling system. *J Biol Chem*, **269**, 1-4.
- Wiley, J.L., Kendler, S.H., Burston, J.J., Howard, D.R., Selley, D.E. and Sim-Selley, L.J. (2008) Antipsychotic-induced alterations in CB1 receptor-mediated G-protein signaling and in vivo pharmacology in rats. *Neuropharmacology*, **55**, 1183-1190.

- Willy, P.J. and Mangelsdorf, D.J. (1997) Unique requirements for retinoid-dependent transcriptional activation by the orphan receptor LXR. *Genes Dev*, **11**, 289-298.
- Wozniak, M., Rydzewski, B., Baker, S.P. and Raizada, M.K. (1993) The cellular and physiological actions of insulin in the central nervous system. *Neurochem Int*, **22**, 1-10.
- Wright, K.L., Vilen, B.J., Itoh-Lindstrom, Y., Moore, T.L., Li, G., Criscitiello, M., Cogswell, P., Clarke, J.B. and Ting, J.P. (1994) CCAAT box binding protein NF-Y facilitates in vivo recruitment of upstream DNA binding transcription factors. *Embo J*, **13**, 4042-4053.
- Wu, C., Butz, S., Ying, Y. and Anderson, R.G. (1997) Tyrosine kinase receptors concentrated in caveolae-like domains from neuronal plasma membrane. *J Biol Chem*, **272**, 3554-3559.
- Wu, Z., Bucher, N.L. and Farmer, S.R. (1996) Induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBPbeta, C/EBPdelta, and glucocorticoids. *Mol Cell Biol*, **16**, 4128-4136.
- Wu, Z., Rosen, E.D., Brun, R., Hauser, S., Adelmant, G., Troy, A.E., McKeon, C., Darlington, G.J. and Spiegelman, B.M. (1999) Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell*, **3**, 151-158.
- Wu, Z., Xie, Y., Bucher, N.L. and Farmer, S.R. (1995) Conditional ectopic expression of C/EBP beta in NIH-3T3 cells induces PPAR gamma and stimulates adipogenesis. *Genes Dev*, **9**, 2350-2363.
- Xiong, S., Chirala, S.S. and Wakil, S.J. (2000) Sterol regulation of human fatty acid synthase promoter I requires nuclear factor-Y- and Sp-1-binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 3948-3953.
- Xu, J. and Liao, K. (2004) Protein kinase B/AKT 1 plays a pivotal role in insulin-like growth factor-1 receptor signaling induced 3T3-L1 adipocyte differentiation. *J Biol Chem*, **279**, 35914-35922.
- Xu, X., Bittman, R., Duportail, G., Heissler, D., Vilcheze, C. and London, E. (2001) Effect of the structure of natural sterols and sphingolipids on the formation of ordered sphingolipid/sterol domains (rafts). Comparison of cholesterol to plant, fungal, and disease-associated sterols and comparison of sphingomyelin, cerebroside, and ceramide. *J Biol Chem*, **276**, 33540-33546.
- Yabe, D., Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (2002) Insig-2, a second endoplasmic reticulum protein that binds SCAP and blocks export of sterol regulatory element-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 12753-12758.
- Yamauchi, Y., Reid, P.C., Sperry, J.B., Furukawa, K., Takeya, M., Chang, C.C. and Chang, T.Y. (2007) Plasma membrane rafts complete cholesterol synthesis by participating in retrograde movement of precursor sterols. *J Biol Chem*, **282**, 34994-35004.
- Yang, T., Espenshade, P.J., Wright, M.E., Yabe, D., Gong, Y., Aebersold, R., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (2002a) Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell*, **110**, 489-500.
- Yang, T.T., Xiong, Q., Enslin, H., Davis, R.J. and Chow, C.W. (2002b) Phosphorylation of NFATc4 by p38 mitogen-activated protein kinases. *Mol Cell Biol*, **22**, 3892-3904.
- Yang, X., Jansson, P.A., Nagaev, I., Jack, M.M., Carvalho, E., Sunnerhagen, K.S., Cam, M.C., Cushman, S.W. and Smith, U. (2004) Evidence of impaired adipogenesis in insulin resistance. *Biochem Biophys Res Commun*, **317**, 1045-1051.
- Yang, X.P., Freeman, L.A., Knapper, C.L., Amar, M.J., Remaley, A., Brewer, H.B., Jr. and Santamarina-Fojo, S. (2002c) The E-box motif in the proximal ABCA1 promoter mediates transcriptional repression of the ABCA1 gene. *J Lipid Res*, **43**, 297-306.
- Yeagle, P.L. (1985) Cholesterol and the cell membrane. *Biochim Biophys Acta*, **822**, 267-287.
- Yeh, W.C., Bierer, B.E. and McKnight, S.L. (1995a) Rapamycin inhibits clonal expansion and adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 11086-11090.
- Yeh, W.C., Cao, Z., Classon, M. and McKnight, S.L. (1995b) Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes Dev*, **9**, 168-181.
- Yieh, L., Sanchez, H.B. and Osborne, T.F. (1995) Domains of transcription factor Sp1 required for synergistic activation with sterol regulatory element binding protein 1 of low density lipoprotein receptor promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 6102-6106.
- Yokoyama, C., Wang, X., Briggs, M.R., Admon, A., Wu, J., Hua, X., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (1993) SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell*, **75**, 187-197.

- Yu, W., Guo, W. and Feng, L. (2004) Segregation of Nogo66 receptors into lipid rafts in rat brain and inhibition of Nogo66 signaling by cholesterol depletion. *FEBS Lett*, **577**, 87-92.
- Zarubin, T. and Han, J. (2005) Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res*, **15**, 11-18.
- Zeng, L., Liao, H., Liu, Y., Lee, T.S., Zhu, M., Wang, X., Stemerman, M.B., Zhu, Y. and Shyy, J.Y. (2004) Sterol-responsive element-binding protein (SREBP) 2 down-regulates ATP-binding cassette transporter A1 in vascular endothelial cells: a novel role of SREBP in regulating cholesterol metabolism. *J Biol Chem*, **279**, 48801-48807.
- Zhao, Z., Ksiezak-Reding, H., Riggio, S., Haroutunian, V. and Pasinetti, G.M. (2006) Insulin receptor deficits in schizophrenia and in cellular and animal models of insulin receptor dysfunction. *Schizophr Res*, **84**, 1-14.
- Zhuang, L., Kim, J., Adam, R.M., Solomon, K.R. and Freeman, M.R. (2005) Cholesterol targeting alters lipid raft composition and cell survival in prostate cancer cells and xenografts. *J Clin Invest*, **115**, 959-968.
- Zick, Y. (2001) Insulin resistance: a phosphorylation-based uncoupling of insulin signaling. *Trends Cell Biol*, **11**, 437-441.
- Zidovetzki, R. and Levitan, I. (2007) Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim Biophys Acta*, **1768**, 1311-1324.
- Zuo, Y., Qiang, L. and Farmer, S.R. (2006) Activation of CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) alpha expression by C/EBP beta during adipogenesis requires a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-associated repression of HDAC1 at the C/ebp alpha gene promoter. *J Biol Chem*, **281**, 7960-7967.

Publicaciones

Los resultados de esta tesis han dado lugar a dos publicaciones científicas:

EFFECTS OF THE ANTIPSYCHOTIC DRUG HALOPERIDOL ON THE SOMASTOSTATINERGIC SYSTEM IN SH-SY5Y NEUROBLASTOMA CELLS

Jana Sánchez-Wandelmer,^{*1} Alberto M. Hernández-Pinto,^{†1} Sonia Cano,^{*} Alberto Dávalos,^{*} Gema de la Peña,^{*} Lilian Puebla-Jiménez,[†] Eduardo Arilla-Ferreiro,[†] Miguel A. Lasunción^{*†‡} and Rebeca Busto^{*‡}

^{*} *Servicio de Bioquímica-Investigación, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain*

[†] *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Alcalá, Madrid, Spain*

[‡] *CIBER de la Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), ISCIII, Spain.*

Aceptada el 4 de Mayo del 2009 para su publicación en Journal Neurochemistry

INHIBITION OF CHOLESTEROL BIOSYNTHESIS DISRUPTS LIPID RAFT/CAVEOLAE AND AFFECTS INSULINRECEPTOR ACTIVATION IN 3T3-L1 PREADIPOCYTES

Jana Sánchez-Wandelmer^a, Alberto Dávalos^a, Martin Giera^b, Sonia Cano^a, Gema de la Peña^a, Miguel A. Lasunción^{a,c,d}, Rebeca Busto^{a,d,*}

^a *Servicio de Bioquímica-Investigación, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain*

^b *Department Pharmazie, Ludwig Maximilians Universität München, Munich, Germany*

^c *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá, Madrid, Spain*

^d *CIBER de la Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), ISCIII, Spain*

Aceptada el 5 de Mayo del 2009 para su publicación en BBA Biomembranes