

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

Programa de Doctorado en Biomedicina



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**REGULACIÓN DE LAS GOTAS LIPÍDICAS EN ADIPOCITOS: PAPEL
DE RAB18 Y CARACTERIZACIÓN DE SU INTERACTOMA**

Yoana Rabanal Ruiz

Córdoba, 2014

TITULO: *Regulación de las gotas lipídicas en adipocitos: papel de RAB18 y caracterización de su intractoma.*

AUTOR: *Yoana Rabanal Ruiz*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2014
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

TÍTULO: Regulación de las gotas lipídicas en adipocitos: Papel de Rab18 y caracterización de su interactoma

AUTOR: YOANA RABANAL RUIZ

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA

Programa de Doctorado en Biomedicina



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

REGULACIÓN DE LAS GOTAS LIPÍDICAS EN ADIPOCITOS: PAPEL DE RAB18 Y CARACTERIZACIÓN DE SU INTERACTOMA

Memoria de Tesis Doctoral presentada por **Yoana Rabanal Ruiz**,
Licenciada en Bioquímica, para optar al grado de **Doctora en Ciencias**.

Los Directores



Dra. María del Mar Malagón Poyato

Catedrática de Biología Celular de la
Universidad de Córdoba



Dr. Rafael Vázquez Martínez

Profesor Titular de Biología Celular de
la Universidad de Córdoba

En Córdoba, a 16 de Junio de 2014



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA



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

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

INFORMAN

Que D. **Yoana Rabanal Ruiz**, Licenciada en Bioquímica, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo titulado **“REGULACIÓN DE LAS GOTAS LIPÍDICAS EN ADIPOCITOS: PAPEL DE RAB18 Y CARACTERIZACIÓN DE SU INTERACTOMA”**, que, bajo nuestro juicio, reúne los méritos suficientes para optar al Grado de Doctora en Ciencias.

Y para que conste, firmamos el presente documento en Córdoba, 16 de Junio de 2014

Firma del/de los director/es

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

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



TÍTULO DE LA TESIS:

Regulación de las gotas lipídicas en adipocitos: papel de RAB18 y caracterización de su interactoma

DOCTORANDO/A:

Yoana Rabanal Ruiz

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

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

Durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, en el periodo comprendido entre julio de 2008 y julio de 2013, la doctoranda Yoana Rabanal Ruiz no sólo ha superado con creces los objetivos planteados al comienzo de la misma, sino que ha desarrollado y validado técnicas experimentales de una gran utilidad para el grupo de investigación, que le han permitido obtener resultados muy relevantes en el campo de la proteína Rab18 y en la biología celular del adipocito, que, en un futuro cercano, quedarán patentes en varias publicaciones. Concretamente, como fruto de la colaboración de Yoana con otros miembros del equipo se han publicado varios trabajos relacionados con su Tesis Doctoral en las revistas "Biochemical Journal", "Journal of Molecular Endocrinology", y "Journal of Biological Chemistry", revistas de referencia dentro de nuestras áreas de investigación.

Por último, la doctoranda ha presentado sus resultados en diferentes congresos de ámbito nacional (6 comunicaciones tipo Póster y 3 Orales de las que dos de ellas recibieron el premio a la Mejor Comunicación en Ciencias de la Salud) e internacional (7 comunicaciones tipo Póster y 4 Orales).

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

Córdoba, 16 de Junio de 2014

Firma del/de los director/es

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

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

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba, bajo la dirección de los Dres. María del Mar Malagón Poyato y Rafael Vázquez Martínez. Dicho proyecto fue subvencionado mediante una beca del Programa Nacional de becas FPU (FPU-AP2008-04554) concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia.

ACRÓNIMOS

aa	Aminoácido
AC	Adenilato ciclasa
ACS	acil-CoA sintetasa
ACSL	acyl-CoA syntetasa de cadena larga
ADN	Ácido deoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
AGPAT	sn-1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferasa
AMP	5' -adenosina monofosfato
AMPC	5' -adenosina monofosfato cíclico
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
Arf	ADP-Ribosylation Factor
ATGL	Lipasa de triglicéridos de tejido adiposo
ATP	5' -adenosina trifosfato
BAT	<i>Brown adipose tissue</i>
BFA	Brefeldina A
Cav1	Caveolina-1
CCT	CTP:fosfocolina citidiltransferasa
CL	Cardiolipina
COPI	<i>Coat Protein I</i>
CPT	CDP-colina:diacilglicerol fosfocolina transferasa
CRAT	Carnitina O-acetil transferasas
CROT	Carnitina O-octanoil transferasas
DAG	Diglicérido
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DMEM	<i>Dulbeco's Modified Eagle Medium</i>
dNTPs	Deoxi-ribonucleótidos trifosfato
DTT	Ditiotreitol
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilén-diamino-tetracético
DGAT1/2	Diacilglicerolaciltransferasa 1/2
EEA1	<i>Early endosomes antigen-1</i>
ERAD	<i>Endoplasmic reticulum-associated degradation</i>
ERGIC	<i>Endoplasmic Reticulum - Golgi complex</i>
FACL	<i>Fatty acid-CoA ligase</i>
FAD	Flavina
GAP	<i>GTPase-activating protein</i>
GEF	<i>Guanine exchange factor</i>
GDI	<i>GDP Dissociation Inhibitor</i>
GDP	Guanosín difosfato
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GMPc	5' -guanosina monofosfato cíclico
GPAT	Glicerol-3-fosfato aciltransferasa
GTP	Guanosín trifosfato
G3P	Glicerol-3-fosfato

HSL	Lipasa sensible a hormona
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ICAM	Molécula de adhesión intracelular
IL-6	Interleuquina 6
IR	Receptor de insulina
IRS	Sustrato del receptor de insulina
JNK	Jun N-terminal quinasa
KO	<i>Knock-out</i>
LD	<i>Lipid droplet</i>
LD-PCR	<i>Long distance polymerase chain reaction</i>
LPAAT	Ácido lisofosfatídico aciltransferasas
LPCAT	Lisofosfatidilcolina aciltransferasa
LPL	Lipoproteína lipasa
LPLAT	Lisofosfolípido acil transferasa
LPPR3	<i>Lipid phophate phosphatase related protein 3</i>
LRBA	<i>Lipopolisacharide responsive beige anchor protein</i>
MAM	<i>Mitochondria-associated membranes</i>
MAPK	<i>Mitogen activated p38 kinase</i>
MAST3	<i>Microtubule associated serin/threonine kinase</i>
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos-1
MGL	Lipasa de monoglicéridos
mRNA	ARN mensajero
MSC	células madre mesenquimales
mTORC1	<i>mTOR-Raptor complex</i>
PA	<i>Phosphatidic acid</i>
PAF	<i>Platelet activator factor</i>
PAP	<i>Phosphatidic acid phosphatase</i>
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PC	Fosfatidilcolina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDE	Fosfodiesterasa
PE	Fosfatidiletanolamina
PG	Fosfatidilglicerol
PEMT	<i>Phosphatidiletanolamine methyl transferase</i>
PH	Dominio de tipo pleckstrina
PI	Fosfatidilinositol
PIP2	Fosfatidilinositol di-fosfato
PIP3	Fosfatidilinositol tri-fosfato
PI3K	Fosfatidilinositol-3 quinasa
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PL	Fosfolípido
PLA₂	Fosfolipasa A2
PLIN	Perilipina 1
PMP70	<i>Peroxisomal membrane protein 70</i>
PPARα	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor alpha</i>

PPARγ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
PP2A	Fosfatasa 2
PS	Fosfatidilserina
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
PTB	Fosfotirosina
RE	Retículo endoplásmico
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RT	Retrotranscripción
SAT	<i>Subcutaneous adipose tissue</i>
Shc	<i>SH2 containing-domain protein</i>
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
SEM	Error estándar de la media
SNAP	<i>Soluble N-ethyl maleimide sensitive factor</i>
SNARE	<i>Soluble N-ethyl maleimide sensitive factor attachment protein receptor</i>
SVF	Fracción de estroma vascular
TAG	Triglicérido
TNFα	Factor de necrosis tumoral
TSC1	Hamartina
TSC2	Tuberina
TZD	Tiazolidineodionas
u.a.	Unidades arbitrarias
UCP-1	<i>Uncoupling protein-1</i>
VAT	<i>Visceral adipose tissue</i>
VCAM	Molécula de adhesión celular vascular
WAT	<i>White adipose tissue</i>

ÍNDICE

SUMMARY	1
RESUMEN	9
1. INTRODUCCIÓN	21
1.1. El tejido adiposo	21
1.2. Composición celular del tejido adiposo: adipocitos y fracción de estroma vascular	22
1.2.1. Regulación del metabolismo lipídico en adipocitos	24
1.3. Gotas lipídicas	32
1.3.1. Composición de fosfolípidos de la cubierta de las gotas lipídicas	33
1.3.2. Composición proteica de la cubierta de las gotas lipídicas	37
1.3.2.1. Proteínas PAT	37
1.3.2.2. Proteínas CIDE	39
1.3.2.3. Proteínas de síntesis de TAG	39
1.3.2.4. Proteínas SNARE	40
1.3.2.5. Proteínas Rab GTPasas	41
1.4. Rab GTPasas	41
1.5. Interacción de las gotas lipídicas con otros orgánulos celulares	51
1.5.1. Citoesqueleto	51
1.5.2. Retículo Endoplásmico	53
1.5.3. Mitocondrias	55
1.5.4. Peroxisomas	58
1.5.5. Endosomas	62
1.5.6. Ribosomas	63
1.6. Patología del tejido adiposo: obesidad e inflamación	63
2. OBJETIVOS	69
3. MATERIALES Y MÉTODOS	73
3.1. Material biológico	73
3.1.1. Cultivo de líneas celulares	73
3.2. Tratamientos experimentales	74
3.2.1. Estudio de la localización intracelular de Rab18	74
3.3. Estudios bioquímicos mediante <i>Western Blotting</i>	75
3.3.1. Obtención de extractos proteicos	75
3.3.2. Aislamiento de fracciones citosólica y de membrana de los adipocitos	76
3.3.3. Aislamiento de LDs	76
3.3.4. Proteómica de LDs	77
3.3.5. Precipitación de proteínas mediante acetona	77
3.3.6. Precipitación de proteínas mediante el método cloroformo/metanol	77
3.3.7. Electroforesis desnaturante y electrotransferencia	78
3.3.8. Inmunodetección y análisis densitométrico	79
3.4. Transfección y electroporación de cultivos celulares	80
3.4.1. Transfección transitoria de líneas celulares	80

3.4.2. Electroporación de líneas celulares	80
3.5. Estudios de microscopía confocal	81
3.6. Estudios de movimiento intracelular mediante videomicroscopía en tiempo real	83
3.7. Estudios funcionales	83
3.7.1. Determinación de la actividad lipolítica celular en células 3T3-L1	83
3.7.2. Determinación de la actividad lipogénica de células 3T3-L1	84
3.7.3. Análisis del papel de Rab18 sobre la señalización mediada por insulina en adipocitos	85
3.7.4. Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS)	86
3.7.5. Determinación de la actividad catalasa	86
3.8. Ensayos de interacción proteína-proteína para la determinación de proteínas efectoras de Rab18	87
3.8.1. Ensayos de inmunoprecipitación	87
3.8.2. Ensayo de doble híbrido en levaduras	88
3.8.2.1. Clonación de la secuencia codificante del gen Rab18 de rata en el vector de expresión de levaduras	89
3.8.2.2. Generación de la librería de tejido adiposo de rata	89
3.8.2.2.1. Extracción de ARN de tejido adiposo de rata	91
3.8.2.2.2. Síntesis de la primera cadena de ADNc	91
3.8.2.2.3. Amplificación del ADNc por PCR de larga distancia (LD-PCR)	91
3.8.2.2.4. Purificación en columna del ADNc	92
3.8.2.3. Transformación de levaduras con el ADNc de tejido adiposo	92
3.8.2.4. Transformación de levaduras	94
3.8.2.5. Control de toxicidad de Rab18	95
3.8.2.6. Control de autoactivación de Rab18	95
3.8.2.7. Análisis de la expresión de Rab18	95
3.8.2.8. Emparejamiento de la cepa Y2HGold [pGBKT7-Rab18] con la librería de ADNc de tejido adiposo	96
3.8.2.9. <i>Screening</i> de las colonias positivas por PCR	97
3.10. Análisis estadístico	98
4. RESULTADOS	101
4.1. Rab18 se asocia preferentemente a las LDs de menor tamaño en condiciones de ayuno	101
4.2. La asociación de Rab18 a la superficie de las LDs depende de la integridad del eje RE-Golgi	108
4.3. Papel del citoesqueleto en la distribución intracelular de Rab18 en adipocitos	111
4.4. Relación espacial y funcional de las Rab18-LDs con otros orgánulos implicados en metabolismo lipídico	116
4.4.1. Retículo Endoplásmico	116
4.4.2. Mitocondrias	121
4.4.3. Peroxisomas	130
4.4.3.1. Repercusión funcional de la interacción entre Rab18-LDs y peroxisomas	139

4.5. Mecanismos moleculares de acción de Rab18. Identificación y caracterización del interactoma de Rab18	140
4.5.1. Proteómica de LDs	140
4.5.2. Inmunoprecipitación	149
4.5.2.1. Estudios de colocalización de Rab18 y MAST3 en adipocitos	150
4.5.2.2. Análisis funcional de la interacción entre Rab18 y MAST3 en adipocitos	151
4.5.3. Ensayo de Doble Híbrido de Levadura (Y2H)	152
4.5.3.1. LPPR3	155
4.5.3.2. LRBA	157
4.6. Rab18 en obesidad	158
4.6.1. Efecto de TNF α sobre la asociación de Rab18 a la superficie de las LDs	158
5. DISCUSIÓN	163
6. CONCLUSIONES	185
7. CONCLUSIONS	189
8. BIBLIOGRAFÍA	193

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1. Principales reguladores del metabolismo lipídico en adipocitos.	25
Figura 2. Entrada de ácidos grasos a través de su unión a CD36 en dominios de la membrana plasmática ricos en caveolina-1.	27
Figura 3. Síntesis de TAGs <i>de novo</i> .	28
Figura 4. Rutas biosintéticas de PC.	35
Figura 5. Distribución celular de las proteínas Rab.	42
Figura 6. Ciclo de vida de una vesícula de transporte intracelular.	42
Figura 7. Ciclo de activación de las Rab GTPasas.	47
Figura 8. Formación de las LDs.	54
Figura 9. Esquema de la biosíntesis de fosfolípidos en mitocondrias.	57
Figura 10. Ruta metabólica de síntesis de plasmalógenos.	61
Figura 11. Inflamación del tejido adiposo en obesidad.	66

MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 12. Reacciones que se llevan a cabo durante la cuantificación de glicerol libre en el medio.	84
Figura 13. Reacciones que se llevan a cabo para la cuantificación de TAGs en las muestras.	85
Figura 14. Sistema de doble híbrido en levaduras.	89
Figura 15. Procedimiento de obtención de la librería en levaduras.	90
Figura 16. Construcción de la librería.	90
Figura 17. Mecanismo de recombinación <i>in vivo</i> por el que se generan los vectores de la librería.	93

RESULTADOS

Figura 18. Colocalización de Rab18 con PLIN en adipocitos 3T3-L1.	102
Figura 19. Efecto de la insulina, el isoproterenol y la privación de suero en la distribución de tamaño de las LDs en adipocitos 3T3-L1.	104
Figura 20. Distribución de colocalización de Rab18 y PLIN en adipocitos 3T3-L1	106
Figura 21. Localización intracelular de Rab18 en adipocitos 3T3-L1 tras la disrupción del eje RE-Golgi.	109
Figura 22: Análisis de la relación espacial entre las Rab18-LDs y los filamentos de actina.	111
Figura 23. Análisis de la relación espacial entre las Rab18-LDs y la red de microtúbulos.	112
Figura 24. Efecto del nocodazol sobre la red de microtúbulos en adipocitos 3T3-L1.	113
Figura 25. Relación espacial de Rab18 con el citoesqueleto de microtúbulos.	114
Figura 26. Imagen renderizada de un adipocito 3T3-L1 teñido con marcadores vitales de RE	117
Figura 27. Videomicroscopía en tiempo real en adipocitos 3T3-L1 transfectados con GFP-Rab18 y teñidos con el marcador vital de RE, <i>ER-tracker</i> , monitorizados bajo condiciones basales y tras estimulación con insulina	118

Figura 28. Estudio de colocalización de Rab18 con la enzima lipogénica DGAT2 en adipocitos 3T3-L1.	119
Figura 29. Estudio de colocalización de Rab18 con DGAT2 en adipocitos 3T3-L1.	120
Figura 30. Videomicroscopía en tiempo real en adipocitos 3T3-L1 transfectados con GFP-Rab18 y teñidos con el marcador vital de mitocondrias <i>Mitotracker</i> monitorizados bajo condiciones basales y tras estimulación con insulina o isoproterenol.	122
Figura 31. Estudio de colocalización de Rab18 con el marcador vital de mitocondrias <i>Mitotracker</i> en adipocitos 3T3-L1. Insulina	124
Figura 32. Estudio de colocalización de Rab18 con el marcador vital de mitocondrias <i>Mitotracker</i> en adipocitos 3T3-L1. Isoproterenol	125
Figura 33. Efecto de la insulina sobre la distribución de Rab18-LDs y mitocondrias en adipocitos 3T3-L1.	127
Figura 34. Efecto del isoproterenol sobre la distribución de colocalización de Rab18-LDs y mitocondrias en adipocitos 3T3-L1.	129
Figura 35. Videomicroscopía en tiempo real de adipocitos 3T3-L1 co-transfectados con DsRed-Rab18 y GFP-SKL y monitorizados bajo condiciones basales y tras estimulación con insulina o isoproterenol.	131
Figura 36. Estudio de colocalización de Rab18 con el marcador de peroxisomas PMP70 en adipocitos 3T3-L1. Insulina.	133
Figura 37. Estudio de colocalización de Rab18 con el marcador de peroxisomas PMP70 en adipocitos 3T3-L1. Isoproterenol.	134
Figura 38. Efecto de la insulina en la distribución de colocalización de Rab18-LDs y peroxisomas en adipocitos 3T3-L1.	136
Figura 39. Efecto del isoproterenol en la distribución de colocalización de Rab18-LDs y peroxisomas en adipocitos 3T3-L1.	138
Figura 40. Ensayos de cuantificación de actividad catalasa y ROS en adipocitos 3T3-L1.	139
Figura 41. Fraccionamiento subcelular de adipocitos 3T3-L1 en condiciones basales o tras estimulación con insulina durante 4 h.	141
Figura 42. Análisis de la distribución subcelular de la proteína GDI2 en adipocitos 3T3-L1.	146
Figura 43. Efecto de la sobreexpresión de GDI2 en la asociación de Rab18 a las LDs.	148
Figura 44. Efecto de la sobreexpresión de la proteína GDI2 en la actividad lipogénica y lipolítica de adipocitos 3T3-L1.	149
Figura 45: Ensayo de inmunoprecipitación para la identificación de posibles interactores de Rab18.	150
Figura 46. Distribución subcelular del dominio quinasa de MAST3 (HA-MAST3K) en adipocitos 3T3-L1.	151
Figura 47. Efecto de la sobreexpresión de Rab18 sobre la fosforilación de Akt y PTEN en adipocitos 3T3-L1.	152
Figura 48. Análisis de la expresión de Rab18 en la cepa de levaduras Y2H Gold y <i>screening</i> por PCR de las colonias de levadura positivas tras el emparejamiento de las cepas.	153
Figura 49. Confirmación de la interacción entre Rab18 y LPPR3.	156

Figura 50. Colocalización de Rab18, LPPR3 y DGAT2 en adipocitos 3T3-L1.	157
Figura 51. Distribución subcelular de LRBA.	157
Figura 52. Localización intracelular de Rab18 en adipocitos 3T3-L1 expuestos a TNF α .	159
Figura 53. Efecto de un ambiente proinflamatorio en la expresión de Rab18 en adipocitos 3T3-L1.	160

SUMMARY

Regulation of lipid metabolism in adipocytes: Role of RAB18 and characterization of its interactome

INTRODUCTION

The adipose tissue (AT) plays a central role in managing the energy stores and as an endocrine organ by producing adipokines that regulate food intake and energy homeostasis, immunity and cardiovascular function (Frayn et al., 2003; Frühbeck, 2008). The excess in AT that occurs in obesity is commonly associated to insulin resistance (IR), which constitutes the main risk factor in the development of type 2 diabetes, hypertension, dyslipidemia and cardiovascular diseases (Kahn & Flier, 2000; Yusuf et al., 2005; Pischon et al., 2008).

Adipocytes represent the main cellular constituent of AT, which also includes the so-called stroma-vascular fraction formed by preadipocytes, blood cells, and vascular tissue (Frayn et al., 2003). Adipocytes store energy in form of triglycerides (TAGs) within a large lipid droplet (LD) characteristic of this cell type (Reue, 2011; Walther & Farese, 2012). During fasting and under the influence of catecholamines, TAGs are hydrolyzed by lipases, releasing fatty acids (FAs) that are transported to other tissues for use as energy source (Duncan et al., 2007; Kolditz & Langin, 2010). On the other hand, in postprandio FAs from the diet are internalized within adipocytes, esterified and stored in LDs. This process is regulated by insulin, which stimulates uptake of FAs and glucose (used for production of glycerol needed for TAG synthesis), and the expression of lipogenic enzymes (Kersten, 2001; Stahl et al., 2002; Ducharme & Bickel, 2008).

In obesity, oxidative stress and endoplasmic reticulum (ER) stress accumulate in adipocytes, processes that generate hypoxia and mechanical stress as a consequence of adipocyte enlargement, and activate pro-inflammatory pathways, such as JNK and NFkB (Hotamisligil, 2010; Bluher, 2013; Trayhurn, 2013). This provokes release of pro-inflammatory factors and chemokines (TNF α , IL-6, MCP-1) that promote macrophage and lymphocyte infiltration within the AT, leading to the low-grade, chronic inflammatory state associated to obesity (Guilherme et al., 2008; Ouchi et al., 2011; Mathis, 2013). Altogether, these insults block differentiation of preadipocytes into adipocytes (adipogenesis) and impair insulin signaling, leading to IR, as well as deregulation of TAG storing and, ultimately, cell death (Guilherme et al., 2008; Ouchi et al., 2011; Mathis, 2013). In summary, lipid metabolism regulation in adipocytes is

key for AT normal functioning and the development of metabolic diseases. In this context, growing number of evidences indicate that alterations in the physiology and regulation of LDs directly influence in the development of such diseases (Guilherme et al., 2008; Olofsson et al., 2008; Greenberg et al., 2011; Kraemer et al., 2013; Konige et al., 2013). LDs are highly dynamic structures that, besides their role in lipid metabolism, participate in other processes such as storage and degradation of proteins, viral replication and protection against bacteria (Reue, 2011; Greenberg et al., 2011; Anand et al., 2012). LDs are composed of a core of neutral lipids (mainly TAGs in adipocytes), surrounded by a phospholipid (PL) monolayer that serves as anchoring surface for diverse proteins (Olofsson et al., 2008; Reue, 2011; Walther & Farese, 2012). These proteins participate in the regulation of lipid homeostasis and play crucial roles in LD biogenesis, PL synthesis and intracellular signaling (Martin & Parton, 2006; Thiele & Spandl 2008; Walther & Farese, 2012; Fujimoto & Parton, 2011; Konige et al., 2013). Thus, besides lipases (HSL, ATGL) and enzymes related with TAG (DGAT2) or PL synthesis (ACSL1, CCT α), LDs present proteins such as perilipins, which regulate TAG storing and hydrolysis (Brasaemle, 2007). They also bear proteins related with intracellular traffic and membrane fusion events, such as Rab, ARF and SNARE proteins (Reue, 2011; Konige et al., 2013). Rab small GTPases are essential regulators of intracellular vesicle traffic, governing endomembrane transport in a highly specific manner (Stenmark, 2009). Specifically, Rab18 has been identified in all the proteomic studies on LDs carried out so far (Murphy et al., 2009; Kolditz & Langin 2010; Konige et al., 2013). Notably, our recent studies on human AT and diverse mouse models have shown that Rab18 expression increases in relation to obesity, which supports a role of Rab18 in the adaptation of adipocytes to this condition (Pulido et al., 2011; Pulido et al., 2013). Furthermore, we have observed that this GTPase, in addition to binding to LDs and regulating lipolysis in response to β -adrenergic agonists, as it was shown earlier by others (Martin et al., 2005; Ozeki et al., 2005), also participates in the insulin-induced lipogenesis, stimulus that also increases association of Rab18 to LDs (Pulido et al., 2011). What is more, Rab18 overexpression increases TAG content (and its silencing does the opposite) and LD size (Pulido et al., 2011). Finally, we also demonstrated that induction of lipolysis or lipogenesis induce apposition of Rab18-LDs to ER (Pulido et al., 2011). Inasmuch as the ER has been proposed to be responsible for LD biogenesis and, in addition, it incorporates FAs derived from lipolysis (Murphy et al., 2009; Reue, 2011), we suggested that Rab18 may promote rapprochement of LDs to ER membranes in order to facilitate bidirectional traffic of lipids between these two organelles (Pulido et al., 2011). Other organelles known to participate in lipid metabolism, mitochondria and peroxisomes, have also been shown to interact with

LDs (Murphy et al., 2009; Reue, 2011; Brasaemle & Wolins, 2012). These organelles cooperate in FA β -oxidation and mediate lipid biosynthesis (Brasaemle & Wolins, 2012). Specifically, mitochondria contain several enzymes (ACS, GPAT) that, together with others from the ER (AGPAT), catalyze TAG synthesis (Brasaemle & Wolins, 2012). Mitochondria and ER are also involved in the synthesis of PLs forming the LD surface (Brasaemle & Wolins, 2012; Penno et al., 2013). Actually, mitochondria synthesize phosphatidylethanolamine (PE) that is transformed into phosphatidilcholine (PC), the main PL of LDs. These enzymatic reactions are carried out in coordination with the ER through the PEMT pathway, which is very active in adipocytes (Reue, 2011; Penno et al., 2013). PC is also synthesized by ER enzymes through the Kennedy pathway (Penno et al., 2013). In turn, peroxisomes, in collaboration with the ER, synthesize ether-PLs (Wanders & Waterham, 2006), including plasmalogens (abundant in the LD surface), which has led to suggest that these organelles facilitate LD assembly (Brasaemle & Wolins, 2012). In fact, KO mice lacking peroxisomal enzymes related with plasmalogen synthesis (Pex7, GNPAT) display small adipocytes and reduced fat depots, whereas administration of a plasmalogen precursor rescues the normal phenotype (Rodemer et al., 2003; Brites et al., 2011). Altogether, these observations suggest that Rab18 may somehow mediate the interaction of LDs with organelles related with the lipid homeostasis (ER, mitochondria and peroxisomes) in order to facilitate use of stored FAs or LD enlargement by incorporation of neutral lipids or PLs. However, to date little is known on the precise role of Rab18 in these processes. Thus, in this work we aimed at analyzing the molecular mechanisms underlying Rab18 function in relation to LD homeostasis and mitochondria and peroxisome functions, as well as identifying the regulatory and effector proteins interacting with the GTPase that will translate its action on lipid metabolism in adipocytes.

MATERIAL AND METHODS

To pursue this objective, we have carried out a multifaceted strategy aimed at analyzing the intracellular distribution of Rab18 in relation to LDs, mitochondria and peroxisomes and the effects that variations in the metabolic conditions of adipocytes can have on these relationships. We have also explored the changes in the composition of the protein coat of LDs after stimulation of lipogenesis in adipocytes. Finally, we have identified Rab18 interacting proteins and investigated their specific role in the regulation of the metabolic status of adipocytes.

To investigate the intracellular distribution of Rab18 in adipocytes under

different conditions, we have used 3T3-L1 cells differentiated into adipocytes with a hormonal cocktail and treated or not with the major lipogenic factor (100 nM), insulin, with a lipolytic agent, the β -adrenergic receptor agonist isoproterenol (10 μ M), or with the pro-inflammatory cytokine TNF α (1 nM). For analyzing the relationship of Rab18-LDs with other organelles participating in the regulation of lipid metabolism, we carried out double immunocytochemistry against Rab18 and specific markers of ER membranes (DGAT2), mitochondria (Mitotracker), or peroxisomes (PMP70). Cells were visualized by confocal microscopy before and after 2 h or 4 h treatments with 100 nM insulin or 10 μ M isoproterenol. The importance of the ER in the incorporation of Rab18 to the LD surface was investigated using BFA treatments, a drug that impairs traffic between ER and Golgi complex. The relative position of Rab18-LDs with the ER, mitochondria and peroxisomes and the contribution of the cytoskeleton in this process were also analyzed after depolymerization of actin filaments (latrunculin B) or microtubules (nocodazol) under basal conditions and after insulin or isoproterenol treatments. We have also monitored in real time the dynamics of mitochondria and peroxisomes in relation with Rab18-LDs by videomicroscopy in living 3T3-L1 adipocytes. Specifically, cells were transfected by electroporation with a vector coding for fluorescently labeled Rab18 and either loaded with Mitotracker or co-transfected with a second expression vector coding for the peroxisome signal peptide SKL fused to GFP. To explore the functional relevance of the mitochondria and peroxisome association to Rab18-LDs, we measured the ROS level and catalase activity in Rab18-overexpressing adipocytes using commercial kits.

Study of the composition of the LD protein coat was carried out on isolated LDs from 3T3-L1 adipocytes, which were obtained by subcellular fractionation techniques. Thus, cells treated or not with 100 nM insulin for 4 h were processed for fractionation and protein extracts from the LD-enriched fractions were identified by HPLC chromatography and mass spectrometry (ion trap). Finally, regulatory proteins and effectors of Rab18 were screened using diverse experimental approaches. An approach consisted in immunoprecipitation of protein extracts from 3T3-L1 cells transfected with a plasmid coding for cMyc-Rab18. A wider search for Rab18 interacting proteins was carried out using yeast-two-hybrid screening. Briefly, a yeast strain was transformed with a bait plasmid coding for Rab18 and mated with other strain expressing a cDNA library obtained from rat subcutaneous adipose tissue. Positive colonies were recovered, checked by PCR and purified for subsequent identification by DNA sequencing.

RESULTS AND DISCUSSION

Adipocyte LDs have been long considered mere energy storing organelles. However, nowadays a growing body of evidence supports the idea that these organelles represent highly dynamic structures that participate in diverse cellular processes. Particularly, in adipocytes they play key roles in the regulation of lipid metabolism (Reue, 2011). Many of the works aimed at establishing the dynamic nature of these organelles have been focused on the analysis of the LD protein coat and have demonstrated that, upon lipolytic stimulation, an important remodeling in the protein composition of the LD surface occurs (Brasaemle et al., 2004; Ding et al., 2012). Similarly, in the proteomic study on LDs carried out in this work, we have shown that lipogenic stimuli, such as insulin treatment, also induce recruitment of new proteins to the LD surface, thus highlighting the importance of the proteins anchored to LDs as translators of the insulin action in adipocytes. Among these proteins are numerous components of the cellular cytoskeleton (i.e. tubulin, vinculin, filamin) and of the intracellular trafficking machinery (i.e. SNARE and Rab proteins), which confirms the dynamic nature of these organelles. Regarding Rab proteins, previous studies and our current work have identified 19 members of this family of proteins associated to the LD surface and, in all these studies, Rab18 has been found as an abundant component of the LD coat (review by Hodges et al., 2010). Two independent groups originally found Rab18 in association to LDs (Martin et al., 2005; Ozeki et al., 2005). They reported that both Rab18 overexpression and stimulation of β -adrenergic receptors increase the presence of the GTPase in the LD surface, which led the authors to relate Rab18 with the regulation of lipid metabolism (Martin et al., 2005; Ozeki et al., 2005). Moreover, Rab18 overexpression provoked LD apposition to ER membranes (Ozeki et al., 2005), which, together with our recent observations that Rab18 overexpression also increased the lipolytic activity of adipocytes, supported the view that this GTPase could mediate lipid mobilization from LDs (Pulido et al., 2011). In this work, we have furthered these observations by demonstrating that a condition of energy deficiency, such as that induced by serum deprivation, represents the strongest inductor of Rab18 recruitment to the LD surface. These results allow us to suggest a relationship between Rab18 function and fasting-induced lipolysis and propose that this GTPase belongs to the cellular machinery responsible for the activation and/or maintenance of lipolysis triggered by caloric restriction.

Moreover, besides the proposed role of Rab18 as mediator of the lipolytic response, recent studies by us have demonstrated that the GTPase also participates in insulin-induced lipogenesis. Thus, insulin promotes interaction of Rab18 with LDs and

the rapprochement of these organelles to ER membranes (Pulido et al., 2011). These and the data regarding lipolysis have led us to propose a dual role for Rab18 in the metabolism of LDs as regulator of both lipogenic and lipolytic processes, probably by mediating the rapprochement of LDs to the ER, which would facilitate the bidirectional lipid traffic between these organelles (Pulido et al., 2011). The videomicroscopy and confocal microscopy experiments presented in the current work confirm and further these data regarding the interaction of Rab18-LDs with the ER. Specifically, we have shown that this rapprochement occurs in a timeframe of minutes after administration of insulin. In addition, we have found that both lipogenic and lipolytic stimuli increase colocalization of Rab18-LDs with specific ER membrane subdomains enriched in the lipogenic enzyme DGAT2, which places Rab18 in lipogenesis-specialized ER zones. In fact, DGAT2 and the enzyme FATP1/acyl-CoA synthase form a complex that functions in the ER-LD interface allowing the physical and functional coupling of TAG synthesis and TAG deposition within LDs (Xu et al., 2012). Interestingly, a very recent work on Dengue virus, which requires the participation of ER and LDs for its replication, has shown the presence of the lipogenic enzyme fatty acid synthase (FAS) on these organelles and the need of Rab18 for its activity (Tang et al., 2014), which further supports the idea of the implication of this GTPase in lipogenesis.

In line with this, the identification of LPPR3 as Rab18 interacting protein by Y2H and immunoprecipitation reinforces our hypothesis on the relationship of this GTPase with the machinery responsible for lipid biosynthesis. Specifically, LPPR3 is a phosphatase that catalyzes the formation of DAG, which represents the substrate for both de novo synthesis of lipids and the synthesis of the main PLs present in the LD surface (PC and PE) through the Kennedy's pathway (Bräuer et al., 2013). Therefore, our data suggest that, by recruiting LPPR3, Rab18 could facilitate synthesis of DAG, thus providing the substrate for DGAT2 to carry out TAG biosynthesis.

Our videomicroscopy and confocal microscopy analysis revealed that both insulin and isoproterenol treatments also induced a higher presence of mitochondria and peroxisomes in close apposition to Rab18-LDs. Rab proteins are known to participate in the tethering, docking and fusion of intracellular membranes by their concerted action with the molecular machinery responsible for these processes. Thus, the present data suggest that Rab18 may facilitate the rapprochement of mitochondria to specific regions of the LD surface. Given the role of mitochondria in FA β -oxidation, isoproterenol-induced association of mitochondria with LDs could take place to favor FA transfer from LDs to mitochondria, which is consistent with the proposed role of Rab18 in the traffic of lipids between intracellular compartments (Ozeki et al., 2005;

Martin et al., 2005; Pulido et al., 2011). In the case of the effect on mitochondria/LD relationship induced by insulin, this and previous studies have suggested that there is a coupling between lipolysis and lipogenesis. Specifically, the energy obtained from the β -oxidation of FAs derived from isoproterenol-induced TAG hydrolysis could serve, among other processes, to promote coupled lipogenesis. Other possibility is that mitochondria provide the LD surface with the PLs necessary for their expansion, process that should occur in parallel to the lipogenesis-driven TAG incorporation. Specifically, mitochondria represent the major source of PE (Osman et al., 2011), the second most abundant PL of the LD surface (Chitraju et al., 2012). This, together with our proteomic analysis on LDs that show the presence of PE binding protein 1 (PEBP1) in the LD protein coat, suggests that PE could be the PL provided by mitochondria during lipogenesis-induced LD enlargement.

As mentioned before, peroxisomes are also recruited to the proximity of LDs in response to both lipogenic and lipolytic stimuli. In particular, peroxisomes are responsible for the β -oxidation of very long-chain fatty acids, which are components of diverse TAGs, cholesterol-esters and PLs (Jai et al., 2007). These organelles also participate in the biosynthesis of ether-PLs, such as plasmalogens (Wanders & Waterham, 2006), which are important components of the LD surface and essential for LD biogenesis and maintenance (Brites et al., 2011). Moreover, Rab18 overexpression in 3T3-L1 adipocytes increases the activity of a key antioxidant enzyme in peroxisomes, catalase, while decreasing reactive oxygen species (ROS) in these cells, thus coupling the physical interaction between Rab18-LDs and peroxisomes to a functional outcome.

Altogether, these data have led to the proposal that Rab18 could serve as a bridge connecting LDs to ER membranes specialized in TAG and PL biosynthesis, as well as to mitochondria and peroxisome metabolism.

Because Rab proteins work in coordination with other proteins (Rab effectors) that translate Rab function into the endomembrane system organization (Stenmark, 2009), in the current work we have searched for Rab18 interacting proteins by Y2H screening and immunoprecipitation, which has allowed, among others, identification of the kinase MAST3 as a Rab18 effector protein. Interestingly, MAST3 inhibits the PI3K inhibitory factor PTEN, thus leading to a prolonged insulin-mediated intracellular signaling (Valiente et al., 2011). In this context, our functional studies show that Rab18 overexpression increases PTEN phosphorylation in 3T3-L1 cells treated with insulin and, consequently, a stronger Akt activation over time. Furthermore, our Y2H screening allowed us to identify E3 ubiquitin-protein ligase (CBL-B) as a putative effector of Rab18. This protein is responsible for ubiquitination of p85, the PI3K

regulatory subunit (Fang et al., 2001). Thus, these results support the view that Rab18 could modulate the insulin action on adipocytes by regulating the activity of key components of intracellular signaling pathway initiated by insulin.

Other protein that has been identified in this work and shown to function as an important negative Rab18 regulator is GDI2, which is shown to prevent the association of the GTPase to the LD surface and to reduce lipogenesis and, to a lesser extent, also lipolysis.

In summary, the data presented in this work, together with those previously reported, indicate that Rab18 is a key component of the LD protein coat in adipocytes, wherein it could act as a mediator in the transduction and adaptative response of these cells to conditions of energy excess (insulin) or deficiency (β -adrenergic stimulation). In addition, our results suggest that, in a lipogenic state, Rab18 could facilitate TAG incorporation into LDs by positioning them in close apposition to DGAT2 enriched subdomains of ER membranes via its physical interaction with the lipogenic enzyme LPPR3, mitochondria and peroxisomes, in order to couple LD remodeling (incorporation and/or mobilization of TAGs and other lipid forms) with other cellular processes taking place in these organelles. Finally, Rab18 could favor the lipogenic action of insulin by its direct interaction with key components of the insulin-mediated intracellular signaling pathway (MAST3/PTEN system).

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

El tejido adiposo (TA) juega un papel fundamental en la gestión de las reservas energéticas y como órgano endocrino productor de adipocinas, que regulan la ingesta y la homeostasis energética, la inmunidad y la función cardiovascular (Frayn *et al.*, 2013; Frühbeck *et al.*, 2008). El exceso de TA en obesidad está comúnmente asociado a resistencia a insulina (IR), lo que constituye un factor de riesgo principal en el desarrollo de diabetes tipo 2, hipertensión, dislipemia y enfermedad cardiovascular, o cáncer (Kahn y Flier, 2000; Yusuf *et al.*, 2005; Pischon *et al.*, 2008).

Los adipocitos constituyen el principal componente celular del TA, que también incluye la fracción de estroma vascular constituida por preadipocitos, células sanguíneas y tejido vascular (Frayn *et al.*, 2003). Los adipocitos acumulan energía en forma de triglicéridos (TAGs) en el interior de la gran gota lipídica (LD) característica de este tipo celular (Reue, 2011; Walther y Farese, 2012). En ayuno, y bajo la influencia de las catecolaminas, los TAGs son hidrolizados por lipasas, liberando ácidos grasos que son transportados para su uso en otros tejidos como fuente de energía (Duncan *et al.*, 2007; Kolditz y Langin, 2010). Por otra parte, en postprandio, los ácidos grasos procedentes de la dieta son internalizados por los adipocitos, esterificados y almacenados en las LDs. Este proceso está regulado por la insulina, que estimula la captación de ácidos grasos y de glucosa (utilizada para la producción del glicerol necesario para la síntesis de TAGs), y la expresión de enzimas lipogénicas (Kersten, 2001; Stahl *et al.*, 2002; Ducharme y Bickel, 2008).

En obesidad, se produce estrés oxidativo y del retículo endoplásmico (RE) en adipocitos, procesos que generan hipoxia y estrés mecánico como consecuencia del incremento del tamaño de los adipocitos, y la activación de rutas pro-inflamatorias, como JNK y NFκB (Hotamisligil, 2010; Bluher, 2013; Trayhurn, 2013). Esto provoca la liberación de factores pro-inflamatorios y quimioquinas (TNF- α , IL-6, MCP-1) que promueven la infiltración del TA por macrófagos y linfocitos, dando lugar al desarrollo del estado de inflamación crónica de bajo grado asociado a la obesidad (Guilherme *et al.*, 2008; Ouchi *et al.*, 2011; Mathis, 2013). Todos estos insultos bloquean la diferenciación de los preadipocitos a adipocitos (adipogénesis) e interfieren en la señalización de la insulina, provocando IR, así como la desregulación del almacenamiento de los TAGs y, en última instancia, la muerte celular (Guilherme *et al.*, 2008; Ouchi *et al.*, 2011; Mathis, 2013). En resumen, la regulación del metabolismo lipídico en los adipocitos es fundamental para el funcionamiento normal del TA y para

el desarrollo de enfermedades metabólicas. En este contexto, numerosas evidencias indican que alteraciones en la fisiología y regulación de las LDs influyen de manera directa en el desarrollo de dichas enfermedades (Guilherme *et al.*, 2008; Olofsson *et al.*, 2008; Greenberg *et al.*, 2011; Kraemer *et al.*, 2013; Konige *et al.*, 2013). Las LDs son estructuras altamente dinámicas que, además de su papel en el metabolismo lipídico, participan en otros procesos como el almacenamiento y la degradación de proteínas, la replicación viral o la protección frente a bacterias (Reue, 2011; Greenberg *et al.*, 2011; Anand *et al.*, 2012). Las LDs están constituidas por un núcleo de lípidos neutros (principalmente TAGs en adipocitos), rodeado por una monocapa de fosfolípidos (PL) a la que se asocian diversas proteínas (Olofsson *et al.*, 2008; Reue, 2011; Walther y Farese, 2012). Estas proteínas participan en la regulación de la homeostasis lipídica y juegan además papeles fundamentales en la biogénesis de LDs, en la síntesis de PL y en la señalización intracelular (Martin y Parton, 2006; Thiele y Spandl, 2008; Walther y Farese, 2011; Fujimoto y Parton, 2011; Konige *et al.*, 2013). Así, además de lipasas (HSL, ATGL) y enzimas relacionadas con la síntesis de TAGs (DGAT2) o de PL (ACSL1, CCT α), las LDs contienen proteínas como las perilipinas, que regulan el almacenamiento e hidrólisis de los TAGs (Brasaemle, 2007). Las LDs también presentan proteínas relacionadas con el tráfico intracelular y los eventos de fusión de membranas, como las proteínas Rab, ARF y SNAREs (Reue, 2011; Konige *et al.*, 2013). Las GTPasas de bajo peso molecular Rab constituyen reguladores esenciales del tráfico vesicular intracelular, dirigiendo el transporte de endomembranas de manera altamente específica (Stenmark, 2009). En concreto, Rab18 se ha identificado en todos los estudios proteómicos de LDs llevados a cabo hasta el momento (Murphy *et al.*, 2009; Kolditz y Langin 2010; Konige *et al.*, 2013). Notablemente, nuestros estudios recientes de TA humano y de diversos modelos murinos nos han permitido mostrar que la expresión de Rab18 aumenta en relación a la obesidad, lo que apoya su papel en la adaptación de los adipocitos a esta condición (Pulido *et al.*, 2011; Pulido *et al.*, 2013). Adicionalmente, hemos observado que esta GTPasa, además de asociarse a las LDs y regular la lipólisis en respuesta a agonistas β -adrenérgicos en adipocitos 3T3-L1 como ya describieron otros (Martin *et al.*, 2005; Ozeki *et al.*, 2005), interviene igualmente en la lipogénesis inducida por insulina, estímulo que también incrementa la asociación de Rab18 a las LDs (Pulido *et al.*, 2011). De hecho, la sobreexpresión de Rab18 aumenta el contenido de TAGs (y su silenciamiento, el efecto contrario) y el tamaño de la LDs (Pulido *et al.*, 2011). Finalmente, demostramos que la inducción de lipólisis o de lipogénesis inducen el acercamiento de las Rab18-LDs al RE (Pulido *et al.*, 2011). Dado que se ha propuesto que el RE interviene en la biogénesis de las LDs y que, a su vez, incorpora los ácidos grasos derivados de la lipólisis (Murphy *et al.*, 2009;

Reue, 2011), sugerimos que Rab18 podría promover el acercamiento de las LDs a las membranas del RE para facilitar el tráfico bidireccional de lípidos entre ambos orgánulos (Pulido *et al.*, 2011). Además del RE, también se ha observado la interacción de otros orgánulos que están involucrados en el metabolismo lipídico, mitocondrias y peroxisomas, con las LDs (Murphy *et al.*, 2009; Reue, 2011; Brasaemle y Wolins, 2012). Estos orgánulos cooperan en la β -oxidación de ácidos grasos e intervienen en la biosíntesis de lípidos (Brasaemle y Wolins, 2012). Concretamente, las mitocondrias presentan varias enzimas (ACS, GPAT) que, junto con otras del RE (AGPAT), catalizan la síntesis de TAGs (Brasaemle y Wolins, 2012). Mitocondrias y RE también intervienen en la síntesis de PL de las LDs (Brasaemle y Wolins, 2012; Penno *et al.*, 2013). Concretamente, las mitocondrias sintetizan fosfatidiletanolamina (PE), que es transformada en fosfatidilcolina (PC), el PL mayoritario de las LDs. Estas reacciones enzimáticas suceden en colaboración con el RE a través de la vía de la PEMT, que es muy activa en adipocitos (Reue, 2011; Penno *et al.*, 2013). La PC también se sintetiza mediante enzimas localizadas en el RE por la ruta de Kennedy (Penno *et al.*, 2013). Por su parte, los peroxisomas sintetizan, en colaboración con el RE, éter-PL (Wanders y Waterham, 2006), incluyendo plasmalógenos (que son abundantes en la superficie de las LDs) lo que ha llevado a sugerir que estos orgánulos contribuyen al ensamblado de las LDs (Brasaemle y Wolins, 2012). De hecho, ratones KO de enzimas del peroxisoma relacionadas con la síntesis de plasmalógenos (Pex7, GNPAT) presentan adipocitos pequeños y depósitos grasos reducidos, mientras que la administración de un precursor de estos compuestos rescata el fenotipo normal (Rodemer *et al.*, 2003; Brites *et al.*, 2011). El conjunto de estas observaciones, junto con nuestros resultados, sugieren que Rab18 podría mediar la interacción de los orgánulos implicados en la homeostasis lipídica (RE, mitocondrias, peroxisomas) con las LDs, para facilitar el uso de los ácidos grasos almacenados o crecimiento de las mismas por la incorporación de lípidos neutros o PL. Sin embargo, hasta la fecha se conoce relativamente poco acerca del papel de Rab18 en estos procesos. Por tanto, el objetivo principal de la presente Tesis Doctoral se centró en el análisis de los mecanismos moleculares que subyacen en la acción de Rab18 en relación con la homeostasis de las LDs y la función de mitocondrias y peroxisomas, así como en la identificación de las proteínas reguladoras y efectoras que interactúan con la GTPasa y que traducirán su acción en el metabolismo lipídico en adipocitos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para llevar a cabo este objetivo, hemos empleado múltiples estrategias encaminadas al análisis de la distribución intracelular de Rab18 en relación a las LDs, las mitocondrias y los peroxisomas y los efectos que conllevan las variaciones de las condiciones metabólicas en estas relaciones. También hemos explorado los cambios en la composición de la cubierta proteica de las LDs tras la estimulación de la lipogénesis en los adipocitos. Por último, hemos identificado proteínas que interaccionan con Rab18 e investigado su papel específico en la regulación del estado metabólico de los adipocitos.

Para investigar la distribución intracelular de Rab18 en adipocitos bajo diferentes condiciones, hemos empleado la línea celular 3T3-L1 diferenciada a adipocitos con un cóctel hormonal y tratadas o no con el principal factor lipogénico, insulina (100 nM), con un agente lipolítico, el agonista de receptores β -adrenérgicos isoproterenol (10 μ M), o la citoquina proinflamatoria TNF α (1 nM). Para el análisis de la relación entre las Rab18-LDs y otros orgánulos que participan en la regulación del metabolismo lipídico, llevamos a cabo doble inmunocitoquímica frente a Rab18 y marcadores específicos de las membranas del RE (DGAT2), mitocondrias (*Mitotracker*) o peroxisomas (PMP70). Las células se visualizaron mediante microscopía confocal antes y después de 2 ó 4 h de tratamiento con insulina 100 nM o isoproterenol 10 μ M. La importancia del RE en la incorporación de Rab18 a la superficie de las LDs se estudió mediante el uso de BFA, una droga que interrumpe el tráfico entre el RE y el complejo de Golgi. La contribución del citoesqueleto en el reclutamiento de Rab18 a las LDs también se analizó tras la despolimerización de los filamentos de actina (latrunculina B) o los microtúbulos (nocodazol) en condiciones basales y tras tratamientos con insulina o isoproterenol. También monitorizamos en tiempo real la dinámica de mitocondrias y peroxisomas en relación con las Rab18-LDs mediante videomicroscopía en adipocitos 3T3-L1 vivos. Concretamente, las células fueron transfectadas mediante electroporación con un vector que expresaba Rab18 marcada con una sonda fluorescente y cargadas con *Mitotracker* o co-transfectadas con un segundo vector de expresión que codifica el péptido señal de peroxisomas SKL fusionado a GFP. Para explorar la relevancia funcional de la asociación de mitocondrias y peroxisomas a las Rab18-LDs, medimos los niveles de ROS intracelulares y la actividad catalasa en adipocitos que sobreexpresaban Rab18 mediante consumo de H₂O₂ y diclorofluoresceína diacetato, respectivamente.

El estudio de la composición de la cubierta proteica de las LDs se llevó a cabo en LDs aisladas a partir de adipocitos 3T3-L1, que fueron obtenidas a partir de

fraccionamiento subcelular. Así, las células tratadas o no con insulina 100 nM durante 4 h fueron procesadas para fraccionamiento y los extractos proteicos de las fracciones enriquecidas en LDs fueron identificados mediante cromatografía HPLC y espectrometría de masas (trampa iónica). Finalmente, para la búsqueda de las proteínas reguladoras y efectoras de Rab18 se utilizaron diferentes aproximaciones experimentales. Una de ellas consistió en la inmunoprecipitación de extractos proteicos de adipocitos 3T3-L1 transfectados con un plásmido que codifica cMyc-Rab18. Una búsqueda de interactores más amplia se llevó a cabo a través del escrutinio en doble híbrido de levadura. En esta técnica, una cepa de levaduras transformada con un plásmido que codifica Rab18 fue emparejada con otra cepa de levaduras que expresaba una librería de cDNA obtenida de tejido adiposo subcutáneo de rata. Las colonias positivas fueron chequeadas por PCR y las bandas de ADN obtenidas se purificaron para su posterior identificación mediante secuenciación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las LDs de los adipocitos han sido consideradas durante mucho tiempo como simples almacenes de energía. Sin embargo, cada vez hay más evidencias que apoyan firmemente la idea de que estos orgánulos constituyen estructuras altamente dinámicas y complejas, que intervienen en numerosos procesos celulares. Particularmente, en adipocitos, estos orgánulos cumplen funciones fundamentales en la regulación del metabolismo lipídico (Reue, 2011). Muchos de los trabajos encaminados a establecer la naturaleza dinámica de estos orgánulos se han centrado en el análisis de la composición proteica de la cubierta de las LDs y han demostrado que, tras la estimulación lipolítica, sucede un importante remodelado de la composición proteica de la superficie de las LDs (Brasaemle *et al.*, 2004; Ding *et al.*, 2012). De igual forma, el ensayo proteómico realizado en este estudio tras la estimulación lipogénica mediante el tratamiento de los adipocitos con insulina nos ha permitido corroborar que también ocurre un reclutamiento de nuevas proteínas a la superficie de las LDs, lo que pone de manifiesto la importancia de las proteínas asociadas a estos orgánulos como mediadores en la traducción de las acciones de la insulina sobre los adipocitos. Entre estas proteínas, encontramos numerosos componentes del citoesqueleto (i.e., tubulina, vinculina, filamina) y de proteínas de tráfico intracelular (i.e., proteínas SNARE y Rabs) asociados a las LDs, lo que confirma la naturaleza dinámica de estos orgánulos. En cuanto a las proteínas Rab, estudios previos además de este trabajo, han identificado 19 miembros de la familia Rab asociados a la superficie de las LDs, y en todos estos estudios, se ha identificado a

Rab18 como un componente abundante de la cubierta de estos orgánulos (revisado en Hodges *et al.*, 2010). Dos grupos de investigación independientes fueron los primeros en describir la asociación de Rab18 en las LDs (Martin *et al.*, 2005; Ozeki *et al.*, 2005). Sus estudios demostraron que tanto la sobreexpresión de Rab18 como la estimulación de la lipólisis a través de receptores β -adrenérgicos inducida por isoproterenol incrementaban la asociación de esta GTPasa a la superficie de las LDs, lo que llevó a los autores a relacionar Rab18 con la regulación del metabolismo lipídico (Martin *et al.*, 2005; Ozeki *et al.*, 2005). Por otra parte, se observó que la sobreexpresión de Rab18 provocaba un aumento en la cantidad de membrana de RE que rodea a las LDs (Ozeki *et al.*, 2005), lo que, junto a nuestros descubrimientos de que la sobreexpresión de Rab18 también aumentaba la actividad lipolítica de adipocitos 3T3-L1 apoyaba la propuesta de que esta GTPasa podría estar implicada en la movilización de los lípidos almacenados en las LDs (Pulido *et al.*, 2011). Los resultados obtenidos en este estudio amplían estas observaciones mostrando que condiciones de deficiencia energética, como la inducida por privación de suero, constituyen el mayor inductor del reclutamiento de Rab18 a la cubierta de las LDs.

Por otra parte, además del papel propuesto para Rab18 como mediador en la respuesta lipolítica, estudios recientes realizados en nuestro laboratorio han demostrado que Rab18 también está involucrada en la lipogénesis inducida por insulina. Así, esta hormona promueve, por una parte, la asociación de Rab18 a las LDs y, por otra, la interacción de las LDs cargadas con esta GTPasa con las membranas del RE (Pulido *et al.*, 2011). Estos estudios, junto con los resultados observados en lipólisis, nos llevaron a proponer un papel dual de Rab18 en el metabolismo de las LDs como regulador tanto de procesos lipogénicos como lipolíticos (Pulido *et al.*, 2011), probablemente mediando el acercamiento de las LDs al RE y facilitando así el tráfico bidireccional de lípidos entre ambos orgánulos (Pulido *et al.*, 2011). Los experimentos de videomicroscopía y microscopía confocal presentados en este trabajo confirman y amplían los datos referentes a la interacción entre las Rab18-LDs y el RE. Concretamente, hemos observado que este acercamiento sucede en cuestión de minutos tras la administración de insulina. Además, hemos observado que tanto estímulos lipogénicos como lipolíticos aumentan la colocalización de las Rab18-LDs con subdominios del RE enriquecidos en la enzima lipogénica DGAT2, lo que sitúa a Rab18 en zonas del RE especializadas en lipogénesis. De hecho, DGAT2 y la enzima FATP1/acil-CoA sintetasa forman un complejo que actúa en la interfase RE-LD permitiendo el acoplamiento físico y funcional entre la síntesis de TAGs y su deposición en las LDs (Xu *et al.*, 2012). Curiosamente, un trabajo muy reciente sobre infección con

el virus del Dengue, que requiere de la participación del RE y las LDs para su replicación, ha demostrado la presencia de la enzima lipogénica FAS (*fatty acid synthase*) en estos orgánulos y la necesidad de Rab18 para su actividad (Tang *et al.*, 2014), lo que refuerza la idea de la implicación de esta GTPasa en los procesos de lipogénesis.

En línea con esto, la identificación de la proteína LPPR3 como posible interactador de Rab18 mediante Y2H e inmunoprecipitación, refuerza nuestra hipótesis sobre la relación de esta GTPasa con la maquinaria responsable de la síntesis lipídica. Específicamente, LPPR3 es una fosfatasa que cataliza la formación de DAG, que constituye el sustrato tanto para la síntesis *de novo* de lípidos como para la síntesis de los fosfolípidos mayoritarios de las LDs (PC y PE) a través de la ruta de Kennedy (Bräuer *et al.*, 2003). Por tanto, nuestros datos sugieren que, mediante el reclutamiento de LPPR3, Rab18 podría facilitar la síntesis de DAG, proporcionando así el sustrato para DGAT2 y, con ello, la síntesis de TAGs.

Nuestros estudios de videomicroscopía y microscopía confocal revelaron que los tratamientos con insulina o con isoproterenol provocaron un aumento de la presencia de mitocondrias y peroxisomas en torno a las Rab18-LDs. Está ampliamente aceptado el papel de las proteínas Rab en el *tethering*, anclaje y fusión de membranas intracelulares mediante su acción concertada con la maquinaria molecular responsable de estos procesos. Nuestros resultados sugieren que Rab18 podría facilitar el acercamiento físico de las mitocondrias a áreas concretas de la superficie de las LDs. En base al papel de las mitocondrias en la β -oxidación de ácidos grasos, la asociación de las mitocondrias a las LDs inducida por isoproterenol podría tener lugar para facilitar la transferencia de ácidos grasos desde las LDs a las mitocondrias, lo que estaría de acuerdo con la propuesta de un papel común para Rab18 en el tráfico de lípidos entre distintos compartimentos celulares (Ozeki *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2005; Pulido *et al.*, 2011). En el caso del efecto en la relación mitocondrias/LDs inducido por insulina, nuestros resultados y los de otros autores apoyan la existencia de un acoplamiento entre los procesos de lipólisis y lipogénesis en respuesta a isoproterenol. En este escenario, la energía resultante de la β -oxidación de los ácidos grasos derivados de la hidrólisis de los TAGs inducida por isoproterenol podría servir, entre otros procesos, para promover la lipogénesis subsecuente. Otra posibilidad es que las mitocondrias proporcionen los PL necesarios para la expansión de la superficie de las LDs, proceso que debe ocurrir en paralelo con la incorporación de TAGs en las LDs inducida por estímulos lipogénicos. Específicamente, las mitocondrias representan la principal fuente de PE (Osman *et al.*, 2011), el segundo componente mayoritario de

la monocapa de fosfolípidos que delimita las LDs (Chitraju *et al.*, 2012). Esto, junto con la identificación de la proteína de unión a PE (PEBP1) en la cubierta de las LDs en adipocitos estimulados con insulina, sugiere que la PE podría ser el fosfolípido que aportara la mitocondria a la gota en el aumento del tamaño de las LDs inducido por lipogénesis.

Como se ha mencionado anteriormente, los peroxisomas también se aproximan a las LDs en respuesta a estímulos tanto lipogénicos como lipolíticos. En particular, los peroxisomas son los responsables de la β -oxidación de ácidos grasos de cadena muy larga, que son los componentes de diversos TAGs, ésteres de colesterol o fosfolípidos (Jai *et al.*, 2007). Estos orgánulos también participan en la biosíntesis de éter-fosfolípidos, particularmente plasmalógenos (Wanders y Waterham, 2006), que son importantes componentes de la superficie lipídica de las LDs y esenciales para su formación y mantenimiento (Brites *et al.*, 2011). Por otra parte, los peroxisomas están directamente involucrados en la protección de las células frente a los efectos deletéreos causados por las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Schrader y Fahimi, 2006). Niveles elevados de Rab18 (y su subsecuente asociación a las LDs) provocaron un aumento significativo de la actividad catalasa además de una disminución de los niveles de ROS intracelulares, lo que sugiere que, Rab18, o el acercamiento de peroxisomas a LDs mediado por la GTPasa, podría favorecer la actividad de los peroxisomas.

En conjunto, los resultados sobre la dinámica del RE, de las mitocondrias y de los peroxisomas con respecto a las Rab18-LDs, permiten sugerir un papel general de la GTPasa en el posicionamiento de dichas gotas en relación a los orgánulos involucrados en la regulación del metabolismo lipídico, con el fin de acoplar la remodelación de las LDs (i.e., incorporación y/o movilización de TAGs y otros lípidos complejos) a otros procesos celulares que tienen lugar en dichos orgánulos. Teniendo en cuenta la relación espacial y funcional de estos orgánulos existente entre RE y mitocondrias y peroxisomas (Lynes y Simmens, 2011), y entre Rab18-LDs y estos tres compartimentos celulares, cabe la posibilidad de que esta GTPasa pueda jugar un papel importante en la interfaz entre dichos orgánulos, sirviendo como puente entre las LDs y zonas concretas del RE relacionadas con mitocondrias (i.e., las MAM) y peroxisomas.

Las proteínas Rab actúan en conjunción con un amplio rango de proteínas accesorias (los efectores de proteínas Rab) que son los responsables de traducir la función específica de las proteínas Rab en la organización del sistema de endomembranas (Stenmark, 2009). Así pues, en este trabajo hemos llevado a cabo una estrategia múltiple para identificar interactores específicos de esta GTPasa mediante Y2H e inmunoprecipitación, lo que nos ha permitido la identificación, entre otros, de la

quinasa MAST3 como proteína efectora de Rab18. Esta proteína es una Ser/Thr quinasa que inhibe al inhibidor de la PI3K, PTEN, permitiendo, por tanto, que la señalización intracelular mediada por insulina sea más duradera (Valiente *et al.*, 2011). En este contexto, nuestros estudios funcionales mostraron que la sobreexpresión de Rab18 incrementa los niveles de fosforilación de PTEN en adipocitos 3T3-L1 tratados con insulina y, consecuentemente, una mayor activación de Akt a lo largo del tiempo. Adicionalmente, nuestro ensayo de Y2H permitió la identificación de la *E3 ubiquitin-protein ligase CBL-B*, como posible interactante de Rab18. Esta proteína es la responsable de la ubiquitinación de p85, la subunidad reguladora de la PI3K (Fang *et al.*, 2001). Así pues, el conjunto de nuestros resultados apoya que Rab18 puede modular la acción de la insulina en adipocitos mediante la regulación de la actividad de componentes clave en la ruta de señalización intracelular mediada por insulina.

Otra proteína identificada en este trabajo que actúa como regulador negativo de Rab18 es GDI2, que impide la asociación de esta GTPasa a la superficie de las LDs y reduce lipogénesis y, en menor medida, lipólisis.

En resumen, los datos presentados en este trabajo, junto con los resultados previos, indican que Rab18 es un componente clave de la cubierta proteica de las LDs en adipocitos, donde podría actuar como mediador en la transducción y respuesta adaptativa de estas células en condiciones de exceso energético (insulina) o deficiencia (estimulación β -adrenérgica). Además, nuestros resultados sugieren que, en un ambiente lipogénico, Rab18 podría facilitar la incorporación de TAGs en las LDs mediante su posicionamiento en cercanía a subdominios de las membranas del RE enriquecidos en DGAT2 a través de su interacción física con la enzima lipogénica LPPR3, mitocondrias y peroxisomas, para acoplar el remodelado de las LDs (incorporación y/o movilización de TAGs y otras formas lipídicas) con otros procesos celulares que suceden en estos orgánulos para permitir una respuesta celular coordinada.

INTRODUCCIÓN

1.1. El tejido adiposo

Durante mucho tiempo se ha considerado al tejido adiposo como un almacén pasivo de lípidos. Sin embargo, en la actualidad se acepta que constituye un depósito energético altamente dinámico, encargado de almacenar el exceso de energía en forma de triglicéridos (TAG) y gestionarlo en periodos de deficiencia nutricional de una forma estrictamente regulada. Por otra parte, el tejido adiposo también representa un sitio fundamental de captación de glucosa, que se utiliza con una doble finalidad: la producción de energía para el funcionamiento celular y la síntesis del glicerol requerido para la esterificación de los ácidos grasos y su almacenaje (revisado en Malagón *et al.*, 2013). Además de intervenir en la gestión de las reservas energéticas, el tejido adiposo actúa como un órgano endocrino, ya que produce una amplia gama de moléculas señalizadoras, las adipoquinas, encargadas de regular procesos tan relevantes como el control de la ingesta y la homeostasis energética, la inmunidad o la función cardiovascular (Kershaw y Flier, 2004). Los niveles de adipoquinas, que fluctúan en relación a la cantidad de masa grasa, comunican al tejido adiposo con otros órganos, como cerebro, músculo e hígado para coordinar la homeostasis energética (Trayhurn y Wood, 2004). Entre las adipoquinas más conocidas se encuentran la adiponectina, que ejerce efectos facilitadores de la acción de la insulina en diferentes células diana (Ahima y Lazar, 2008), la leptina, que juega un papel esencial en la regulación del peso corporal actuando sobre la ingesta y el gasto energético (Oswal y Yeo, 2010; Mantzoros *et al.*, 2011), o la resisitina, considerada una citoquina proinflamatoria (Jamaluddin *et al.*, 2012).

El tejido adiposo es un órgano complejo que se distribuye en múltiples localizaciones discretas, con grandes acumulaciones reconocidas como depósitos específicos con propiedades metabólicas secretoras y características moleculares distintas. Los principales depósitos grasos, constituidos por tejido adiposo blanco (WAT), incluyen la grasa visceral o intra-abdominal (VAT) y la subcutánea (SAT), situada bajo la piel a lo largo de todo el cuerpo (Kelley *et al.*, 2000). Estos depósitos presentan importantes diferencias en cuanto a su actividad metabólica: VAT presenta una mayor sensibilidad a catecolaminas y glucocorticoides y por tanto, mayor actividad lipolítica comparado con SAT, mientras que este último se caracteriza por una mayor sensibilidad a insulina y a las drogas antidiabéticas tiazolidinedionas (TZD) (Wajcheberg, 2000). Además, los preadipocitos de SAT presentan una mayor capacidad de diferenciación y una menor tasa apoptótica en comparación con los de VAT (Tchkonia *et al.*, 2005). Estas diferencias también se extienden a su perfil secretor, así VAT libera mayores cantidades de citoquinas (IL-6, TNF- α) y quimioquinas que SAT

(Fain *et al.*, 2004), mientras que SAT secreta mayores niveles de adiponectina (Phillips *et al.*, 2008).

Además de WAT, los mamíferos contienen un segundo tipo de tejido adiposo, el tejido adiposo marrón (BAT), con características metabólicas, celulares y bioquímicas diferentes de las del WAT. A diferencia del WAT, que está diseñado específicamente para el almacén de energía, el BAT se encarga de mantener la temperatura corporal vía termogénesis sin escalofrío mediante la disipación de la energía almacenada en forma de calor. Esta propiedad es debida a la expresión de la proteína desacoplante 1 (UCP1), que desvincula la fosforilación oxidativa de la síntesis de ATP, resultando en la generación de calor. En neonatos, que presentan una gran capacidad termogénica (Clarke *et al.*, 1997), se han detectado grandes cantidades de BAT, localizadas predominantemente alrededor de los órganos internos y en las regiones intercapsular y supraclavicular (Aherne y Hull, 1966), constituyendo en conjunto entre el 2 y 4% del peso al nacer (Alexander y Bell, 1975; Hull y Segall, 1965). Recientemente se ha demostrado que los humanos adultos también poseen grasa marrón funcional, aunque en cantidades variables en relación con la edad, el género, la temperatura y el peso corporal (Virtanen *et al.*, 2009). En relación con este descubrimiento, con posterioridad se ha descrito la existencia de un tercer tipo de grasa, la grasa “beige” o “brite” que, como BAT, tiene capacidad termogénica, aunque presenta un patrón de expresión génica diferente a los adipocitos marrones clásicos. De hecho, se ha propuesto que los adipocitos de grasa beige, que aparecen entremezclados entre los adipocitos de WAT, se corresponderían realmente con la grasa marrón observada en individuos adultos (Wu *et al.*, 2012). Estos adipocitos beige o inducibles están programados para ser bifuncionales, es decir, son empleados como almacén energético en ausencia de estímulos termogénicos pero, cuando reciben las señales apropiadas, son capaces de producir calor (Wu *et al.*, 2012). A diferencia de los adipocitos marrones, que derivan de células de linaje muscular caracterizadas por la expresión del factor de transcripción miogénico 5 (myf-5), los adipocitos beige y los adipocitos blancos compartirían un origen común (Wu *et al.*, 2012).

1.2. Composición celular del tejido adiposo: adipocitos y fracción de estroma vascular

Los adipocitos constituyen el principal componente celular del tejido adiposo. Estas células se encuentran inmersas en una matriz de colágeno en la que también residen células madre mesenquimales, preadipocitos, terminales nerviosos, células

sanguíneas y tejido vascular que, en conjunto, constituyen la denominada fracción de estroma vascular (SVF) (Frayn *et al.*, 2003). Todos estos componentes son esenciales para el mantenimiento de la función del tejido adiposo.

Concretamente, los adipocitos son células esféricas, de tamaño muy variable, que puede oscilar entre 20 y 200 μm de diámetro. Los adipocitos blancos son células uniloculares caracterizadas por contener una gran gota lipídica central (*lipid droplet*; LD), y un núcleo plano localizado en la periferia celular (Bloor y Symonds, 2014). Así, su principal función es la acumulación de energía en estos orgánulos especializados, las LDs, que almacenan TAGs, diglicéridos (DAGs), fosfolípidos, ácidos grasos no esterificados y colesterol (Murphy, 2001; Kuerschner *et al.* 2008). La utilización de estas reservas energéticas está estrictamente regulada por distintos sistemas que actúan de manera coordinada para originar una respuesta celular adecuada a los estímulos extracelulares. Así, en condiciones de deficiencia energética, los TAGs son rápidamente hidrolizados y los ácidos grasos resultantes son liberados a la circulación para ser transportados hasta otros tejidos, donde son utilizados como fuente energética (revisado en Duncan *et al.*, 2007). En la situación contraria, tras la ingesta, los ácidos grasos procedentes de la dieta son esterificados y los TAGs resultantes son almacenados en la LD característica de este tipo celular. A pesar de estar prácticamente ocupados por grasa, los adipocitos también son ricos en orgánulos, que se localizan en la estrecha franja periférica que rodea la LD central.

Entre los componentes de la SVF se encuentran las células madre mesenquimales (MSCs) y los preadipocitos, que darán lugar a la renovación de las células maduras del tejido (Rodeheffer *et al.*, 2008). Se ha demostrado que, en humanos, el incremento del tejido adiposo en adultos conlleva fundamentalmente un aumento del tamaño de los adipocitos preexistentes (Bjorntorp, 1974; Spalding *et al.*, 2008), si bien los adipocitos adultos muestran una importante tasa de renovación, tanto en individuos delgados como en obesos (Spalding *et al.*, 2008; van Harmelen *et al.*, 2003). El proceso de formación de adipocitos, o adipogénesis, constituye un proceso complejo que implica la acción coordinada de numerosos factores de transcripción, efectores extracelulares y rutas de señalización intracelular (revisado en Fève, 2005; Rosen y MacDougald, 2006; Lefterova y Lazar, 2009; Christoloudides *et al.*, 2009; White y Stephens, 2010), los cuales conducen las fases sucesivas de este proceso: determinación y parada del crecimiento celular, expansión clonal y diferenciación terminal (Otto y Lane, 2005). Así, se ha implicado a la ruta de señalización de las proteínas Wingless (Wnt) en la regulación del mantenimiento de las MSCs del tejido adiposo, así como en su proliferación y tasa de determinación y en la

diferenciación de los preadipocitos (revisado en Christoloudides *et al.*, 2009). Por su parte, está bien establecido que la diferenciación de los preadipocitos en las etapas iniciales de la adipogénesis, tras la parada en la fase del ciclo G0-G1, es inducida por estímulos hormonales, los cuales causan la expresión inmediata de los miembros de la familia *CCAAT/enhancer-binding proteins* (C/EBPs) C/EBP β y δ , que inducen la expansión clonal mitótica de los preadipocitos y, a continuación, la expresión de dos factores adipogénicos principales, el receptor de activación de proliferación de peroxisomas (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*; PPAR γ) y de C/EBP α (revisado en Christoloudides *et al.*, 2009). Estos dos últimos factores estimulan su propia transcripción, además de inducir la activación de numerosos efectores intracelulares que definirán finalmente el fenotipo adipocitario (revisado en Lefterova y Lazar, 2009; Christoloudides *et al.*, 2009). Además de estos factores, se han identificado otras proteínas que intervienen en el proceso de adipogénesis como SREBP-1, factores de tipo Krüppel (KLF), STAT5, Rev-er α , IRF3/4, etc. y proteínas reguladoras del ciclo celular (revisado en Rosen y MacDougald, 2006; Lefterova y Lazar, 2009; Christoloudides *et al.*, 2009; White y Stephens, 2010) y se ha establecido igualmente la influencia de hormonas, citoquinas, factores de crecimiento y nutrientes en este proceso (revisado en Fève, 2005).

1.2.1. Regulación del metabolismo lipídico en adipocitos

El almacenamiento y la utilización de la reserva energética contenida en las LDs están sometidos a un complejo sistema de regulación multifactorial. Así, la insulina es el principal regulador endocrino de los procesos de almacenamiento mientras que la lipólisis está regulada por varias señales hormonales, principalmente catecolaminas y péptidos natriuréticos (Czech *et al.*, 2013; Moro *et al.*, 2004). Los mecanismos de actuación de estos reguladores se describen en la Fig. 1. A continuación se describen éstos y otros reguladores que intervienen en la regulación del metabolismo lipídico en los adipocitos.

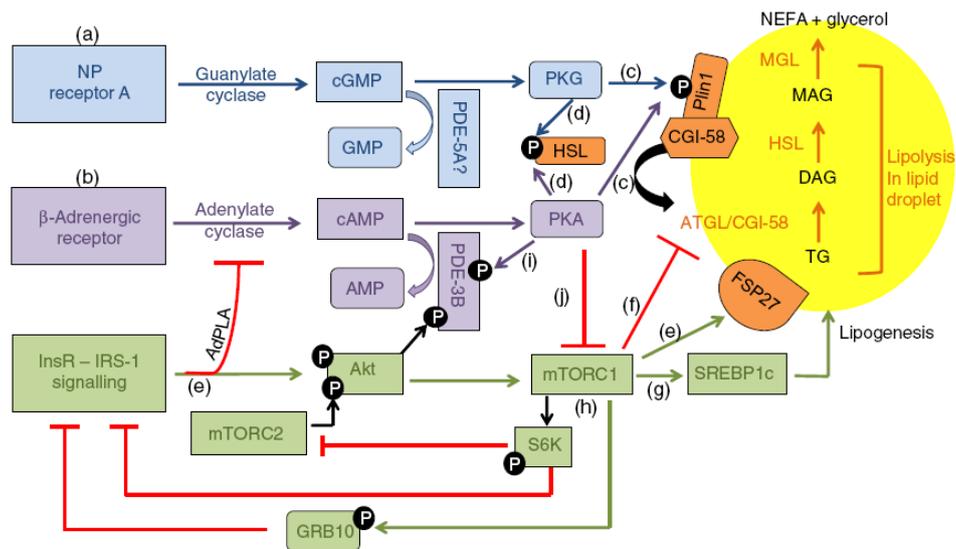


Figura 1. Principales reguladores del metabolismo lipídico en adipocitos. Catecolaminas y péptidos natriuréticos regulan el proceso de lipólisis incrementando los niveles intracelulares de AMPc y GMPC, respectivamente, que activan las lipasas que hidrolizan los TAGs acumulados en el interior de las LDs. Este proceso es inhibido por la insulina que disminuye los niveles de AMPc, a la vez que aumenta la actividad lipogénica celular. Tomado de Czeck *et al.*, 2013.

- Insulina

La insulina es la hormona anabólica más importante, capaz de promover la síntesis y almacenamiento de carbohidratos, lípidos y proteínas e inhibir su degradación (Saltiel y Kahn, 2001). Su función fundamental en la mayoría de los tejidos periféricos es incrementar la captación de glucosa, disminuyendo de esta manera la concentración de glucosa en sangre (Frayn *et al.*, 2003). En adipocitos, la insulina estimula tanto la captación de ácidos grasos como de glucosa, la cual es utilizada para la síntesis del glicerol necesario para la esterificación y almacenamiento de los ácidos grasos en forma de TAGs (Ducharme y Bickel, 2008; Kraemer *et al.*, 2013). Además, la insulina ejerce un potente efecto inhibitorio de la lipólisis, por lo que no sólo favorece el almacenamiento de lípidos sino que también disminuye los niveles circulantes de ácidos grasos.

La señalización por insulina se inicia a través de su unión a un receptor tirosina quinasa, el receptor de insulina (IR), cuya activación provoca su autofosforilación y la fosforilación en residuos de tirosina (Tyr) de las proteínas conocidas como sustratos del receptor de insulina (IRS), y de las proteínas Cbl y Shc (Pessin y Saltiel, 2000; White, 2003). Las proteínas IRS se unen directamente al motivo fosforilado del IR activado a través de un dominio de unión a fosfotirosina (PTB). Estas proteínas se caracterizan por poseer en su estructura un dominio N-terminal de tipo pleckstrina (PH) y hasta 20

sitios potenciales de fosforilación en Tyr en su región central y el extremo C-terminal, que al ser activados por el IR, proporcionan sitios de unión para proteínas efectoras intracelulares con dominios SH2 (*Src homology 2*). Entre ellas se incluyen Grb2 y Nck, proteínas adaptadoras pertenecientes a la familia Src de Tyr quinasas citoplasmáticas (Fyn y Csk), la proteína Tyr fosfatasa SHP2 y la subunidad reguladora (p85) de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) de tipo 1A. La interacción del IRS fosforilado y Shc con Grb2 activa la ruta Ras/MAPK (Bevan, 2001), que media los efectos mitogénicos de la insulina. Por su parte, la interacción entre dos dominios SH2 de la subunidad reguladora de la PI3K y los motivos fosfotirosina del IRS induce el reclutamiento y activación de la subunidad catalítica (p110) de dicha enzima, dando lugar a fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3), que genera sitios de reconocimiento para proteínas que contienen el dominio PH. De esta forma, sirve de anclaje para las quinasas de serina/treonina PDK1 y Akt/proteína quinasa B (PKB) (Kanzaki, 2006; Pessin y Saltiel, 2000) y facilita la interacción de Akt con sus quinasas reguladoras, PDK1 y el complejo mTOR-Rictor (Hresko y Mueckler, 2005; Kanzaki, 2006), provocando la fosforilación de Akt en los residuos Thr-308 y Ser-473, respectivamente, y su activación. El principal regulador de las acciones metabólicas de la insulina es la proteína Akt, encargada de la fosforilación y la regulación de numerosos sustratos (Manning y Cantley, 2007). Entre ellos, se encuentra la proteína activadora de Rab GTPasas, AS160 (Sano *et al.*, 2007). La fosforilación de AS160 provoca su inhibición, lo que a su vez permite la activación de varias proteínas Rab que intervienen en el tráfico del transportador de glucosa GLUT4 hacia la membrana plasmática (Kanzaki, 2006). Otro sustrato de Akt es la tuberina (TSC2), también inhibida por fosforilación, la cual forma un complejo con la hamartina (TSC1) (Harris y Lawrence, 2003). Dicho complejo inhibe al regulador de crecimiento mTOR, por lo que la regulación negativa del complejo TSC1/2 por Akt conduce finalmente a la activación del complejo mTOR-Raptor (mTORC1) (Huang y Manning, 2009), el cual se ha demostrado que, además de estimular la lipogénesis y promover el almacenamiento de lípidos en adipocitos, suprime la lipólisis a través de la inhibición de los niveles de ARNm de la lipasa de TAGs, la desnutrina/ATGL. (Chakrabarti *et al.*, 2010). Ésta no es la única vía por la que Akt es capaz de inhibir la lipólisis. De hecho, la activación de Akt también provoca la fosforilación y activación de la fosfodiesterasa 3B (PDE), lo que conlleva a la reducción de los niveles de AMP cíclico (AMPC) y de la actividad de la proteína quinasa A (PKA), mediadora fundamental en el proceso lipolítico. (Eriksson *et al.*, 1995). Además, se han identificado recientemente otros sustratos fosforilados por Akt, como la proteína quinasa dependiente de AMP, AMPK, que media los efectos positivos de la insulina sobre el almacenamiento de lípidos en los adipocitos (Berggreen *et al.*, 2009; Rahn *et*

al., 1994). Los mecanismos de señalización de insulina en tejido adiposo estimulan la entrada de los ácidos grasos y su conversión a TAGs, la principal forma de almacén de lípidos en humanos. Concretamente, la entrada de ácidos grasos del espacio extracelular requiere la liberación de la albúmina o de las lipoproteínas que los transportan por acción de la lipoproteína lipasa (LPL) para ser posteriormente internalizados por translocasas de ácidos grasos (Ehehalt *et al.*, 2006) como FAT/CD36 (Lafontan, 2008). En adipocitos, se ha propuesto la contribución de las caveolas a la síntesis de TAGs (Ost *et al.*, 2005). De hecho, se ha demostrado la presencia del marcador de caveolas, caveolina-1, en la superficie de las LDs y su transporte hasta la membrana plasmática en respuesta a ácidos grasos, a los cuales se ha demostrado que se une (Parton y Simons, 2007; Pol *et al.*, 2004) (Fig. 2). Se ha propuesto que caveolina-1 podría estar implicada en la incorporación de los ácidos grasos regulando la disponibilidad de FAT/CD36 en la superficie (Lafontan, 2008).

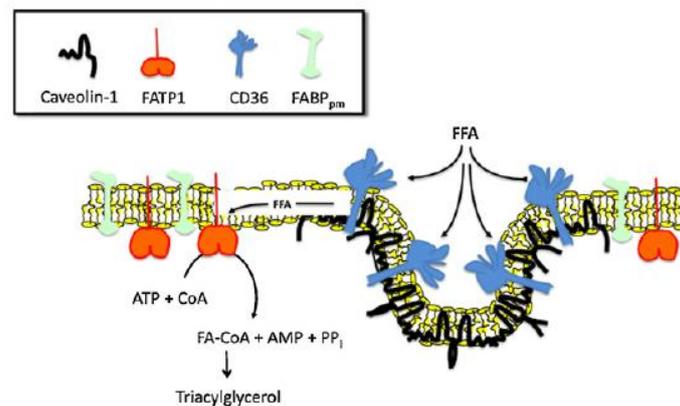


Figura 2. Entrada de ácidos grasos a través de su unión a CD36 en dominios de la membrana plasmática ricos en caveolina-1. Los ácidos grasos difunden lateralmente en la membrana plasmática y a través de *flip-flop* llegan a la cara interna de la membrana donde son esterificados por la proteína transportadora de ácidos grasos FATP1. Tomado de Thompson *et al.*, 2010.

Una vez en el interior celular, es necesaria la activación de los ácidos grasos mediante su esterificación con coenzima A (CoA). Este proceso ocurre en una reacción de dos pasos dependiente de ATP que es catalizada por la enzima acil-CoA sintetasa (ACS) (Ellis *et al.*, 2010). Se han descrito al menos tres miembros de la familia ACS que se asocian a las LDs: ACSL1, ACSL3 y ACLS4. La inhibición de estas ACSLs con Triacsina C (Tomoda *et al.*, 1987) reduce la síntesis de TAGs (Igal *et al.*, 1987) e inhibe completamente la formación de las LDs estimulada por ácidos grasos (Kassan *et al.*, 2013). Para la síntesis de TAGs, el ácido graso activado es procesado a continuación

por dos enzimas localizadas en el retículo endoplásmico (RE): la glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT) y la sn-1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferasa (AGPAT). La primera une glicerol-3-fosfato al ácido graso, generando así ácido lisofosfatídico, que es el sustrato de la segunda enzima, la sn-1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferasa, que da lugar a ácido fosfatídico, el intermediario central en la síntesis de TAGs. El siguiente paso lo lleva a cabo la fosfatasa del ácido fosfatídico (PAP/lipin) que cataliza la formación de DAGs que serán convertidos en TAGs gracias a la reacción de esterificación mediada por las enzimas diacilglicerolaciltransferasas (DGAT). En la Fig. 3 se muestra la cascada de reacciones implicadas en la síntesis de TAGs.

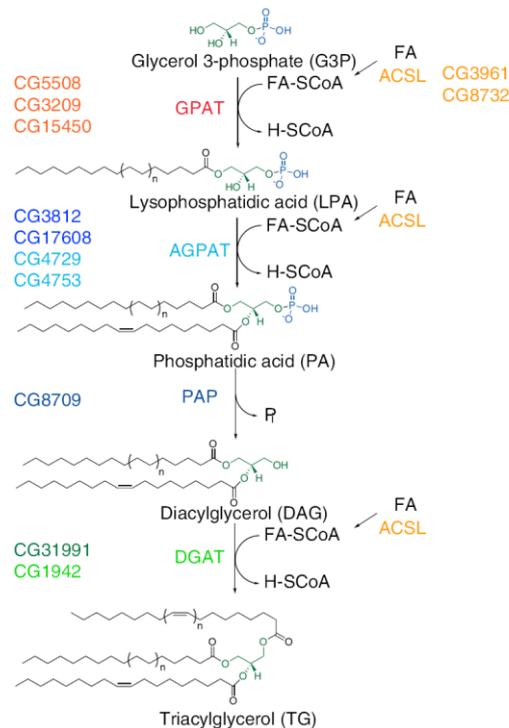


Figura 3. Síntesis de TAGs *de novo*. En el esquema se representan la cascada de reacciones y las enzimas implicadas en la síntesis de TAGs. Tomado de Wilfling, 2013.

La activación de la cascada de señalización de la insulina, también pone en marcha diversos mecanismos involucrados en revertir dicha señalización que actúan fundamentalmente sobre los residuos de Tyr y/o Ser de los distintos componentes de dicha cascada. De esta forma, la tirosina fosfatasa PTPB1 regula negativamente al receptor de insulina (Pessin y Saltiel, 2000; White, 2003) y las quinasas S6K, ERK y JNK inactivan a IRS mediante fosforilación en residuos de Ser. Estos dos puntos de regulación de la ruta aparecen alterados en condiciones de resistencia a insulina, donde se han encontrado niveles de expresión elevados de PTP1B y un aumento de la fosforilación de IRS (Boura-Halfon y Zick, 2009; Pessin y Saltiel, 2000). Por su parte, la

actividad de la PI3K está regulada por la fosfatasa PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) que, tras la terminación de la activación del IR, media la rápida desfosforilación de PIP3, lo que resulta en el desensamblaje de las proteínas reclutadas a membrana por el dominio PH, que vuelven de nuevo al citoplasma (Hodakoski *et al.*, 2014). En cuanto a la actividad de Akt, ésta está regulada fundamentalmente por desfosforilaciones mediadas por proteínas como la fosfatasa 2 (PP2A) (Kuo *et al.*, 2008) o PHLPP (Gao *et al.*, 2005).

-Catecolaminas y péptidos natriuréticos

La hidrólisis activa de los lípidos almacenados en las LDs para liberar glicerol y ácidos grasos a la circulación sucede en condiciones de escasez de nutrientes y en respuesta al ejercicio. El glicerol y los ácidos grasos liberados son utilizados en el hígado para los procesos de gluconeogénesis y cetogénesis, respectivamente, mientras que, en el músculo, los ácidos grasos se utilizan para la obtención de energía en forma de ATP tras su β -oxidación en mitocondrias (Ducharme y Bickel, 2008). Este proceso de hidrólisis está estrictamente regulado, entre otros factores, por catecolaminas y péptidos natriuréticos (Villena *et al.*, 2004). Mientras que la primera es la ruta más estudiada y se ha encontrado alterada en obesidad (Lafontan y Langin, 2009), la lipólisis estimulada por péptidos natriuréticos es activada tras exposición a frío, incrementando la actividad termogénica del tejido adiposo blanco mediante la ruta dependiente de la quinasa p38 activada por mitógenos (MAPK) (Bordicchia *et al.*, 2012). Estos reguladores inducen el proceso de lipólisis aumentando los niveles intracelulares de AMPc (en el caso de catecolaminas) o GMPc (péptidos natriuréticos), activando a las lipasas que hidrolizan los TAGs acumulados en el interior de las LDs: la lipasa de TAG de adipocitos (ATGL) que cataliza el paso de TAG a DAG, y la lipasa sensible a hormonas (HSL), que presenta una gran afinidad por DAG (Ducharme y Bickel, 2008). Por otra parte, la expresión de la monoacilglicerol lipasa (MGL), que completa el último paso del proceso de lipólisis, es constitutiva en tejido adiposo y su actividad no está regulada (Jaworski *et al.*, 2007).

-Regulación por catecolaminas

Las catecolaminas ejercen su función estimuladora de la lipólisis tras su unión a receptores β -adrenérgicos acoplados a proteínas Gs, predominantemente a través de los receptores β 1 y β 2 en tejido adiposo humano, y β 3 en roedores (Lonnqvist *et al.*, 1995; Barbe *et al.*, 1996). Estos receptores activan la adenilato ciclasa (AC), lo que

provoca un incremento en los niveles de AMPc y la activación de la PKA (Razani y Lisanti, 2001). Esta quinasa es la principal mediadora de los efectos de la estimulación lipolítica por catecolaminas a través de la fosforilación de varias proteínas implicadas en la hidrólisis de los TAGs. Así, la PKA fosforila a una de las proteínas que están presentes en la monocapa de fosfolípidos que rodea a las LDs, la perilipina (PLIN), que está asociada a la superficie de estos orgánulos de manera constitutiva (Wolins *et al.*, 2006a). Tras la fosforilación, PLIN, que en condiciones basales se encuentra asociada al coactivador de ATGL, CGI-58, libera este factor, permitiendo su interacción con ATGL y, con ello, la activación de la hidrólisis de los TAGs del interior de las LDs (Granneman *et al.*, 2007; Yamaguchi *et al.*, 2007). Por otro lado, la PKA también fosforila a la HSL en 3 sitios (Ser-563 -inactivo-, Ser-659 y Ser-660) causando su activación y con ello su interacción con FABP4 (Shen *et al.*, 2001), una proteína citosólica que participa en el transporte intracelular de ácidos grasos y ácido retinoico (Matarese y Bernlohr, 1988). En particular, FABP4 actúa como chaperona para facilitar la entrada de ácidos grasos y la lipólisis (Furuhashi y Hotamisligil, 2008), además de promover la salida de ácidos grasos hacia el exterior celular. Otra proteína que interacciona con HSL es la proteína lipotransina, un miembro de la familia katanina que facilita la translocación y anclaje de HSL a la superficie de la LDs (Syu y Saltiel, 1999). Así, el complejo formado por HSL y FABP4 se transloca desde el citosol hasta la superficie de las LDs donde HSL interacciona con el extremo amino terminal de PLIN y cataliza la hidrólisis de lípidos (Smith *et al.*, 2007; Brasaemle *et al.*, 2000). Por último, la MGL, requerida para la hidrólisis final de los 2-monoglicéridos derivados de la acción de la HSL, cataliza la liberación de ácidos grasos y glicerol (Fredrikson *et al.*, 1986). Adicionalmente, se han descrito otras lipasas implicadas en la lipólisis de adipocitos, entre las que cabe destacar algunos miembros de la familia PNPLA, como la adiponutrina, PNPLA4 o PNPLA5 (Lake *et al.*, 2005). Una activación prolongada de la lipólisis induce modificaciones tanto de la distribución de las proteínas asociadas a las LDs como del tamaño de éstas, ya que conlleva una disminución del tamaño de las LDs, proceso dependiente de la fosforilación de PLIN en el residuo Ser-492 (Marcinkiewicz *et al.*, 2006), lo que favorece la acción de las lipasas ya que incrementa la superficie disponible para su actuación. La hidrólisis del AMPc a AMP por fosfodiesterasas es el primer paso de la terminación del proceso lipolítico. Como consecuencia de esto, la proteína CGI-58 se disocia de ATGL, volviendo a unirse a PLIN, y HSL vuelve al citosol, donde es inactiva. Todo esto provoca finalmente la disminución de la actividad lipolítica celular (Lafontan y Langin, 2009). Por otra parte, la actividad lipolítica estimulada por catecolaminas también puede ser inhibida por varias rutas, entre ellas la mediada por los receptores α 2-adrenérgicos, que se unen a proteínas G inhibitoras

(Gi) que inactivan la AC. Con ello disminuyen los niveles intracelulares de AMPc, y, en consecuencia, la actividad de la PKA (Egan *et al.*, 1992). No obstante, el principal regulador con un efecto antilipolítico más potente es la insulina. Esta hormona, a través de la ruta PI3K/Akt, activa la fosfodiesterasa 3B, disminuyendo la concentración de AMPc intracelular y, con ello, la actividad de la PKA (Lafontan y Langin, 2009). Además, la insulina también es capaz de inhibir la lipólisis a través de la activación de la proteína fosfatasa 1, que actúa sobre HSL desactivándola, lo que conlleva también a una disminución de la actividad lipolítica celular (Jaworski *et al.*, 2007).

-Regulación por péptidos natriuréticos

La estimulación de la lipólisis por péptidos natriuréticos parece ser especialmente relevante cuando los receptores β -adrenérgicos están bloqueados (Moro *et al.*, 2004). La estimulación de la lipólisis se ejerce a través de su unión a la isoforma A activa del receptor de péptidos natriuréticos, lo que provoca un incremento en los niveles GMPc y con ello, la activación de la proteína quinasa G (PKG), que fosforila las mismas dianas que PKA, HSL y PLIN, de forma independiente a la estimulación β -adrenérgica (Moro *et al.*, 2004; Sengenès *et al.*, 2000; Sengenès *et al.*, 2003). Su papel en el incremento de la termogénesis del tejido adiposo junto con el hecho de que su expresión está disminuida en obesidad (Bordicchia *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2004), hace de la ruta de señalización del receptor A de péptidos natriuréticos una potencial diana terapéutica.

-TNF α

Una ruta alternativa de regulación de la lipólisis tiene lugar a través de la citoquina proinflamatoria TNF α , que además provoca resistencia a insulina en adipocitos (revisado en Thompson *et al.*, 2010). Esta citoquina actúa a través de su receptor 1 en adipocitos, lo que produce la activación de las quinasas ERK y JNK (Ryden *et al.*, 2002). Su actuación sobre la lipólisis es múltiple. Por una parte, inhibe la señalización de insulina a través de la fosforilación en Ser de IRS-1, lo que limita su fosforilación en Tyr y, por tanto, termina la señal (Gual *et al.*, 2005; Fujishiro *et al.*, 2003). Por otra parte, disminuye la expresión de todas las formas de inhibidores de proteínas G (Gai) en adipocitos de roedores incrementando así la actividad de la AC y la lipólisis (Gasic *et al.*, 1999), aunque esta ruta no se ha visto en células humanas tratadas con TNF α . Finalmente, ERK y JNK disminuyen la expresión de PLIN e indirectamente incrementan su fosforilación. Este incremento en la fosforilación es

debido a la disminución de la transcripción de PDE3B mediante ERK lo que resulta en un incremento de los niveles de AMPc y la activación de la PKA (Zhang *et al.*, 2002). Así, la disminución de la expresión de PLIN por TNF α resulta en un incremento de la lipólisis basal y en una disminución de la lipólisis estimulada (Ryden *et al.*, 2002; Souza *et al.*, 2003).

-Ghrelin

Recientemente se ha descrito el papel de la ghrelina, un péptido derivado del estómago, en la estimulación de la adiposidad del tejido adiposo. Concretamente, este péptido actúa sobre adipocitos blancos y marrones promoviendo la adipogénesis y la entrada de glucosa, además de inhibir la lipólisis (Granata y Ghigo, 2013). Estudios recientes en ratones deficientes en la proteína supresora de tumores p53 sugieren que las acciones de la ghrelina sobre WAT están mediadas por esta proteína (Porteiro *et al.*, 2013).

-Péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1)

GLP-1 es una hormona que contribuye al control de la homeostasis de la glucosa por su acción insulínica. Experimentos con la línea celular 3T3-L1 han mostrado un efecto dual, dosis-dependiente, de GLP-1 sobre lipogénesis y lipólisis. Concretamente, su acción estimuladora de lipólisis en adipocitos 3T3-L1 se produce mediante la activación de la ruta AC/AMPc (Vendrell *et al.*, 2011).

1.3. LDs

Las LDs son estructuras complejas y altamente dinámicas que, además de su papel central en la gestión de los recursos energéticos, participan en otros procesos tan relevantes como el almacenamiento y degradación de proteínas, la síntesis de membranas, la producción de moléculas derivadas de lípidos, la replicación viral o la protección frente a bacterias (Anand *et al.*, 2012; Reue *et al.*, 2011; Greenberg *et al.*, 2011; Ducharme y Bickel, 2008; Fujimoto *et al.*, 2008). El interés en la biología celular de este orgánulo se ha incrementado exponencialmente en la última década debido a la relación establecida entre las LDs y el desarrollo de enfermedades metabólicas (Guilherme *et al.*, 2008; Kraemer *et al.*, 2013; Konige *et al.*, 2013).

Las LDs, que están presentes en muchos tipos celulares, son estructuras de forma redondeada cuyo diámetro puede ser muy variable, oscilando desde 0,1 a 5 μm de diámetro en células no adipocitarias y hasta 100 μm en adipocitos blancos. Están constituidas por un núcleo de lípidos neutros, principalmente TAGs, ésteres de colesterol, ésteres de retinol y colesterol. En adipocitos blancos predominan los TAGs, mientras que el ratio entre TAGs y ésteres de colesterol es variable en otros tipos celulares. El núcleo hidrofóbico está rodeado por una monocapa de fosfolípidos a la que se asocian diversas proteínas (Walther y Farese, 2012; Reue *et al.*, 2012; Olofsson *et al.*, 2008; Brasaemle *et al.*, 2004; Fujimoto y Parton, 2011), que pueden unirse a ésta a través de hélices anfipáticas, anclajes lipídicos o mediante estructuras de tipo horquilla (Digel *et al.*, 2010). Entre las proteínas que forman la cubierta se encuentran enzimas relacionadas con la síntesis de TAGs (DGAT2) o fosfolípidos (ACSL1, CCT α), lipasas (HSL, ATGL) o la familia de las perilipinas, que regulan el almacenamiento e hidrólisis de los TAGs. Además, estudios proteómicos recientes han puesto de manifiesto la presencia en las LDs de proteínas relacionadas con el tráfico intracelular y la fusión de membranas, como las proteínas de la familia de GTPasas de bajo peso molecular Rab, los factores v- y t-SNARE, proteínas motoras y distintos componentes del citoesqueleto (Ducharme y Bickel, 2008; Walther y Farese, 2012).

1.3.1. Composición de fosfolípidos de la cubierta de las LDs

La monocapa de fosfolípidos de las LDs difiere en su composición de otras membranas celulares como las del RE, el aparato de Golgi o la membrana plasmática (Tsuchi-Sato *et al.*, 2002). Tanto en células de mamífero como en levaduras, el fosfolípido mayoritario de la cubierta de las LDs es la fosfatidilcolina (PC), que constituye hasta un 60% del contenido total de fosfolípidos (Leber *et al.*, 1994; Bartz *et al.*, 2007; Chitraju *et al.*, 2012), seguido de fosfatidiletanolamina (PE, 24%), fosfatidilinositol (PI, 8%), fosfatidilserina (PS) y las formas liso de PC y PE (Leber *et al.*, 1994; Tsuchi-Sato *et al.*, 2002; Bartz *et al.*, 2007). De forma general, las LDs pueden contener otros fosfolípidos, normalmente en menores cantidades, aunque algunos estudios han demostrado la presencia de elevadas cantidades de esfingomiélin (SM) en LDs aisladas de fibroblastos (McIntosh *et al.*, 2010) y adipocitos 3T3-L1 (Blouin *et al.*, 2010). El ácido fosfatídico, que es un intermediario en la biosíntesis de lípidos, no se ha encontrado en cantidades elevadas en las LDs. Sin embargo, el diacilglicerol (DAG), que es el producto generado a partir del ácido fosfatídico, sí que es capaz de acumularse en cantidades considerables en la superficie de las LDs (Chitraju *et al.*, 2012; Blouin *et al.*, 2010; Kuerschner *et al.*, 2008) al igual que el colesterol no esterificado, que también aparece en LDs de adipocitos (Kovanen *et al.*, 1975; Prattes *et al.*, 2000).

Una vez formadas, las LDs no intercambian membranas lipídicas con otros orgánulos mediante la vía canónica de transporte vesicular. Por el contrario, la expansión de su superficie y su remodelado dependen de otras rutas, que incluyen la síntesis local, el transporte monomérico mediado por proteínas y el transporte por sitios de contacto o continuidades de membrana (revisado en Penno *et al.*, 2013). La síntesis del fosfolípido mayoritario de la superficie de las LDs, la PC, se lleva a cabo a partir de dos rutas: la ruta de Kennedy, que utiliza CDP-colina y DAG, y la ruta de la PE-metiltransferasa (PEMT), que conlleva la metilación de la PE (Fig. 4). Una vez generada, la composición de los ácidos grasos de la PC puede ser modificada mediante procesos de desacilación y reacilación secuencial en el ciclo de Lands. La enzima CTP:fosfocolina citidiltransferasa (CCT), que cataliza el paso limitante en la biosíntesis *de novo* de PC en la ruta de Kennedy, la formación de CDP-colina, ha sido localizada recientemente en las LDs (Krahmer *et al.*, 2011, Guo *et al.*, 2008), indicando una función reguladora de las LDs en la tasa de síntesis de PC. Sin embargo, las LDs no poseen la enzima responsable del último paso en la síntesis de PC, CDP-colina:diacilglicerol fosfocolina transferasa (CPT) (Moessinger *et al.*, 2011), que se localiza en el RE. Consecuentemente, la actividad CCT de las LDs por sí sola no puede proporcionar fosfolípidos adicionales para la expansión de la superficie de estos orgánulos. En algunos tipos celulares, como hepatocitos y adipocitos, la PC puede ser sintetizada de forma alternativa por la ruta PEMT (Vance y Vance, 2004). Esta ruta de síntesis secuencial de PC a PS y, de ésta, a PE (catalizadas por las enzimas PS-sintetasa 1 y PS-d Descarboxilasa, respectivamente) y de PE a PC, catalizada por la enzima PEMT, tiene lugar en el RE y las mitocondrias en estrecha asociación con las LDs (Horl *et al.*, 2011). En adipocitos cultivados, PEMT se ha encontrado asociada a las LDs (Pol *et al.*, 2014). La adición de ácidos grasos induce la actividad PEMT en adipocitos, y los ratones *knock-out* (KO) para PEMT son resistentes a la obesidad inducida por dieta (Jacobs *et al.*, 2010). Estos descubrimientos demuestran la importancia de la síntesis alternativa de PC para el metabolismo de las LDs, aunque aún se desconoce si la PC generada es utilizada directamente para la expansión de las LDs y cómo llega hasta la superficie de las LDs.

El remodelado de los ácidos grasos de los fosfolípidos por el ciclo de Lands consiste en la eliminación secuencial del ácido graso de la posición sn-2 por la fosfolipasa A2 (PLA₂), seguida de la reacilación mediante lisofosfolípido acil transferasas (LPLAT). En las LDs de varios tipos celulares se ha demostrado la presencia de una fuerte actividad lisofosfatidilcolina aciltransferasa (LPCAT) mediada por la enzimas LPCAT 1 y 2 (Moessinger *et al.*, 2011). La acción de estas enzimas en

combinación con la actividad soluble PLA₂, permitiría cambios en la composición de los fosfolípidos de las LDs. De forma consistente con la actividad de remodelado de LPCAT1/2 en las LDs, la PC de las LDs está enriquecida en ácidos grasos monoinsaturados, y difiere de la PC del RE (Tauchi-Sato *et al.*, 2002; Bartz *et al.*, 2007) y de la generada a partir de PEMT (DeLong *et al.*, 1999). Los principales candidatos para la actividad PLA₂ en las LDs son cPLA₂ α (Gubern *et al.*, 2008; Guijas *et al.*, 2012) y adPLA (Duncan *et al.*, 2008; Jaworski *et al.*, 2009).

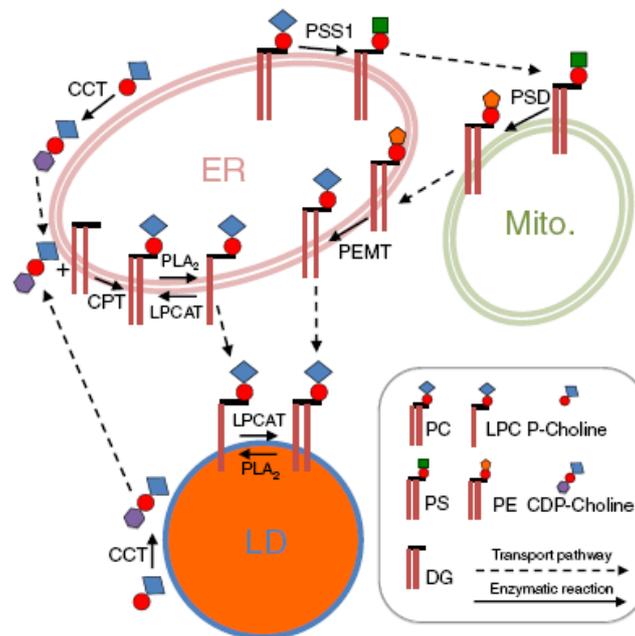


Figura 4. Rutas biosintéticas de PC. La PC puede sintetizarse a partir de la ruta de Kennedy por la acción secuencial de CCT y CPT. Además, hepatocitos y adipocitos pueden sintetizar PC a partir de la ruta PEMT. En esta ruta, el RE produce PS, que se transloca entonces a las mitocondrias, donde se forma PE que es enviada de nuevo al RE para la generación de PC. Tomado de Penno *et al.*, 2013.

La principal función de la monocapa de fosfolípidos es la separación del ambiente hidrofóbico del interior de las LDs, del entorno acuoso proporcionado por el citosol. Para mantener la integridad de este orgánulo, su superficie debe proteger de eventos de fusión espontánea con otras LDs y otros orgánulos de membrana. Durante la expansión rápida de las LDs, los diámetros de estos orgánulos pueden incrementarse más de tres veces en cuestión de horas. Por tanto, las células necesitan sintetizar y transportar grandes cantidades de fosfolípidos para expandir la superficie de las LDs.

La inhibición de la síntesis de PC promueve el incremento en la síntesis de TAGs (Jackowski *et al.*, 2000, Caviglia *et al.*, 2004) y el aumento del tamaño de las LDs

(Krahmer *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2008; Moessinger *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011). Se ha observado que, en respuesta a la depleción de PC en el RE, se produce un aumento en la síntesis de TAGs, que estaría mediado por la activación del factor de transcripción SREBP-1 (Walker *et al.*, 2011). Sin embargo, el incremento en el tamaño de las LDs podría producirse como consecuencia de un incremento en la fusión de las LDs (Krahmer *et al.*, 2011, Penno *et al.*, 2013). A pesar de que el proceso de fusión de LDs aún continúa siendo objeto de debate (Boström *et al.*, 2007; Murphy *et al.*, 2010), estudios muy recientes han demostrado que las LDs son capaces de transferirse lípidos en un proceso lento mediado por sitios de contacto que requiere la proteína Fsp27/Cidec (Gong *et al.*, 2011; Paar *et al.*, 2012; Ariotti *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2013).

Otra de las funciones propuestas para la monocapa de fosfolípidos es el reclutamiento diferencial de proteínas a las LDs. Estudios combinados de proteómica y lipodómica en levaduras han demostrado la influencia de la genética y de la disponibilidad de nutrientes en la composición del proteoma y el lipidoma de las LDs (Grillitsch *et al.*, 2011; Fei *et al.*, 2011). Sin embargo, aún no se ha esclarecido si los cambios específicos en la composición lipídica de la cubierta de las LDs son la causa de las alteraciones del proteoma. En general, la composición lipídica, particularmente la presencia de fosfoinositoles, puede ser una señal de reclutamiento de proteínas a membranas, contribuyendo a la identidad de los orgánulos. La superficie de las LDs no muestra una composición drásticamente diferente a la de otros orgánulos, y hasta el momento no hay indicios de la presencia de fosfoinositoles en su superficie. Por su parte, los procesos de lipogénesis y lipólisis conllevan un gran recambio (*turnover*) de DAGs. Sin embargo, existen diferencias en los intermediarios que se utilizan en estas dos rutas de manera que, mientras que en la lipogénesis se utiliza 1,2-DAG como sustrato para la síntesis de TAGs, los DAGs resultantes de la lipólisis basal y estimulada son 1,3-DAG y 2,3-DAG, respectivamente (Eichmann *et al.*, 2012). Estas diferencias en DAGs podrían servir como señales para el reclutamiento diferencial de proteínas con funciones específicas en ambas rutas. De acuerdo a esto, se ha propuesto que la presencia de DAGs en las LDs y el RE es importante para el reclutamiento de las perilipinas no residentes (TIP47, S3-12 y OXPAT) (Skinner *et al.*, 2009). Otra posibilidad es que la fluidez de la monocapa podría servir como señal para el reclutamiento diferencial de proteínas de la familia de las perilipinas (Storey *et al.*, 2011).

Además de la composición de la superficie lipídica, el tipo de lípidos neutros almacenados en las LDs define las especies de perilipinas que forman parte de la cubierta (Hsieh *et al.*, 2012). Esto está además condicionado por la distinta densidad de fosfolípidos de la monocapa de las LDs comparado con una bicapa (Mitsche *et al.*,

2010). También se ha propuesto que intermediarios metabólicos específicos (DAG o colesterol) presentes en las LDs pueden influir igualmente el tipo de proteínas que se asocia a la cubierta de estos orgánulos (Mitsche *et al.*, 2010).

1.3.2. Composición proteica de la cubierta de las LDs

Hasta la fecha se ha descrito la asociación de una gran variedad de proteínas a las LDs, muchas de las cuales han sido identificadas a partir de estudios proteómicos de la cubierta de estos orgánulos. Estas proteínas están implicadas en procesos muy diferentes que, entre otros, incluyen desde la regulación de la homeostasis lipídica a la biogénesis de LDs, la síntesis de fosfolípidos de membrana y hormonas esteroideas y la señalización celular o el almacenamiento temporal y lipidación de ciertas proteínas (Walther y Farese 2012; Konige *et al.*, 2013; Fujimoto y Parton, 2011; Thiele y Spandl, 2008; Zweytick *et al.*, 2000; Murphy, 2001; Fujimoto y Ohsaki, 2006; Martin y Parton, 2006). A continuación se describen algunas de las proteínas de la cubierta de las LDs que se ha demostrado que cumplen funciones esenciales en la homeostasis de estos orgánulos.

1.3.2.1. Proteínas PAT

En mamíferos, la familia PAT de proteínas de unión a LDs comprende 5 miembros: perilipina/PLIN (PLIN1), adipofilina/ADRP (PLIN2), la proteína *Tail-interacting protein* de 47 kDa (TIP47/PLIN3) (Miura *et al.*, 2002), S3-12 (PLIN4) y MDLP/OXPAT/PAT-1 (PLIN5) (Brasaemle, 2007; Londos *et al.*, 2005; Kimmel *et al.*, 2010). De todos los miembros de la familia, sólo PLIN está asociada a la superficie de las LDs de forma constitutiva; el resto se translocan hasta la superficie de éstas bajo diferentes estímulos (Wolins *et al.*, 2006a). La expresión de PLIN se limita a adipocitos de WAT y BAT y a células esteroideogénicas de la corteza adrenal, testículo y ovario. Concretamente, PLIN ejerce un papel doble sobre las LDs: en condiciones basales actúa protegiéndolas de la acción de las lipasas, mientras que la estimulación de la lipólisis provoca su fosforilación y permite el acceso de las enzimas HSL y ATGL a la superficie de las gotas para así hidrolizar los TAGs localizados en su interior (Sztalryd *et al.*, 2003; Yamaguchi *et al.*, 2004; Lass *et al.*, 2006; Granneman *et al.*, 2007; Brasaemle, 2007). Los adipocitos en cultivo presentan LDs centrales de mayor tamaño, con bajo contenido en PLIN, y gotas periféricas de menor tamaño en las que la PLIN es más abundante, siendo esta última población, por tanto, lipolíticamente más activa (Moore *et al.*, 2005). Además de su papel en la hidrólisis de TAGs, se ha propuesto que PLIN podría regular el crecimiento y la expansión de las LDs. Así, las LDs nacientes están recubiertas de

TIP47 y S3-12, que son reemplazadas por ADRP cuando las LDs crecen (Wolins *et al.*, 2005). Con el tiempo, PLIN desplaza toda la ADRP de la superficie de la LD unilocular. Esto implica que PLIN podría promover la formación de LDs de gran tamaño, lo que es apoyado por el hallazgo de que ratones deficientes en PLIN exhiben LDs de un tamaño drásticamente reducido (Tansey *et al.*, 2001; Martínez-Botas *et al.*, 2000). Este efecto podría deberse, al menos en parte, a una lipólisis aberrante, pero también podría relacionarse con el papel de PLIN en el crecimiento de las LDs, en el que intervendría de una forma indirecta interaccionando con factores relacionados con la fusión de las LDs, como Fsp27/Cidec.

La proteína ADRP actúa de igual forma que PLIN, evitando el acceso de las lipasas a las gotas (Listenberger *et al.*, 2007). No obstante, ADRP se expresa de forma elevada en el comienzo de la diferenciación adipocitaria pero es sustituida de forma progresiva por PLIN a medida que crecen las LDs (Brasaemle, 2007). De hecho, su nivel de expresión en adipocitos diferenciados es menor que en células no adipocitarias (Brasaemle *et al.*, 1997), si bien se ha demostrado su presencia en las LDs de adipocitos de ratones KO para la PLIN (Tansey *et al.*, 2001). De todas formas, ADRP presenta una menor capacidad protectora frente a la lipólisis basal comparada con PLIN. Así, los ratones KO para PLIN presentan una actividad lipolítica elevada en condiciones basales, un contenido lipídico bajo y son delgados y resistentes a la obesidad inducida por dieta (Martínez-Botas *et al.*, 2000; Tansey *et al.*, 2001).

En cuanto a TIP47, se sugiere igualmente que podría tener un papel protector frente a la lipólisis (Fujimoto *et al.*, 2008), aunque también participa en otras funciones no relacionadas con las LDs, como el reciclado del receptor de manosa-6-fosfato, formando un complejo con este receptor y la proteína Rab9 (Aivazian *et al.*, 2006; Carroll *et al.*, 2001).

Por su parte, S3-12 se expresa de forma abundante en adipocitos (Brasaemle, 2007), localizándose en asociación con la superficie de las LDs periféricas originadas tras la estimulación del almacenamiento de TAGs mediante adición de oleato al medio de cultivo (Wolins *et al.*, 2005; Wolins *et al.*, 2003). Sobre la base de estos descubrimientos, se ha propuesto la participación de esta proteína en el almacenamiento de lípidos y estabilización de las LDs en formación (Brasaemle, 2007). Como en el caso de ADRP, S3-12 sería finalmente sustituida por PLIN a lo largo del proceso de maduración de las LDs (Wolins *et al.*, 2005).

Por último, OXPAT se localiza en asociación con las LDs en músculo cardíaco y esquelético y en adipocitos marrones, donde además de llevar a cabo una función inhibitoria de la lipólisis, favorece la acumulación de TAGs (Wolins *et al.*, 2006b).

1.3.2.2. Proteínas CIDE

La familia proteica CIDE se compone de 3 miembros: Cidea, Cideb y Cidec cuya expresión es dependiente de tejido. Así, mientras que Cidea se expresa principalmente en adipocitos marrones, Cidec/Fsp27 lo hace en adipocitos blancos, y Cideb limita su expresión a hígado (revisado en Konige *et al.*, 2014). Estas 3 proteínas se localizan tanto en RE como en la superficie de las LDs (Puri *et al.*, 2007; Qi, *et al.*, 2008) y que presentan regiones de homología con PLIN, incluyendo un dominio hidrofóbico que parece ser importante para su unión a la monocapa de fosfolípidos de las LDs (Puri *et al.*, 2008a). Así, se ha demostrado que la expresión de Fsp27 está regulada por el receptor de activación de proliferación de peroxisomas gamma (PPAR γ) y promueve la formación de LDs uniloculares (revisado en Gong *et al.*, 2011). De hecho, los ratones deficientes en Fsp27 presentan adipocitos blancos multiloculares (Puri *et al.*, 2007; Nishino *et al.*, 2008; Puri *et al.*, 2008b) y la expresión ectópica de Fsp27 en fibroblastos u otras células no adiposas incrementa el tamaño de las LDs y reduce la hidrólisis de TAGs (Puri *et al.*, 2008b; Kim *et al.*, 2008; Ye *et al.*, 2009). En este sentido, se ha propuesto que Fsp27, además de inhibir la lipólisis, podría facilitar la fusión de las LDs (Puri *et al.*, 2007; Keller *et al.*, 2008; Nishino *et al.*, 2008; Jambunathan *et al.*, 2011; Gong *et al.*, 2011). Aunque aún se desconocen los mecanismos moleculares por los que podría controlar la lipólisis, un trabajo reciente ha mostrado la capacidad de Fsp27 para limitar la asociación de ATGL a la superficie de las LDs bien por competición directa con ATGL por los sitios de unión a la LD o facilitando la reorganización de otras proteínas o lípidos en la superficie de las LDs que evitaría la unión de ATGL (Yang *et al.*, 2013).

1.3.2.3. Proteínas de síntesis de TAGs

Recientemente se ha identificado la presencia de enzimas implicadas en la síntesis de TAGs en la superficie de las LDs. Entre ellas cabe destacar proteínas involucradas en la activación de los ácidos grasos a través de su esterificación con Coenzima A, como es el caso de ACSL3, así como el resto de enzimas que completan la ruta de síntesis de TAGs: GPAT4, AGPAT3, PAP y DGAT2 (Kuerschner *et al.*, 2008; Stone *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011; Wilfling *et al.*, 2013). En este sentido, se acepta que la

acumulación de todas estas proteínas en las LDs les proporciona la maquinaria necesaria para la síntesis de TAGs. En particular, GPAT4 presenta una elevada expresión en tejido adiposo y se distribuye principalmente en RE y LDs (Pol *et al.*, 2014). Estudios recientes han puesto de manifiesto que, en respuesta a insulina, esta enzima se fosforila e incrementa su actividad (Shan *et al.*, 2010). Por su parte, AGPAT3 es una proteína de membrana que cataliza la formación de PA en las LDs, además de en la cara citosólica del RE. La asociación de PAP a las LDs también está regulada por fosforilación, de manera que, al fosforilarse, esta enzima se transloca desde el citosol hacia la superficie de las LDs (Pol *et al.*, 2014) donde lleva a cabo la desfosforilación del PA para generar DAG. Finalmente, DGAT2, que está implicada en el último paso de la generación de TAG, es una proteína transmembrana que clásicamente se ha situado en las membranas del RE (Gidda *et al.*, 2011). Sin embargo, otros estudios en células COS 7 han encontrado que condiciones de estimulación de síntesis de TAGs, como el tratamiento con ácido oleico, relocalizan esta proteína en las LDs, donde colocaliza con mitocondrias (Stone *et al.*, 2009).

1.3.2.4. Proteínas SNARE

Las proteínas SNARE están involucradas en los procesos de reconocimiento y fusión de membranas intracelulares, de manera que las SNAREs presentes en la membrana diana (t- o Q-SNAREs) interactúan de forma específica con las que se encuentran en vesículas (v- o R-SNAREs), lo que permite el acercamiento y la fusión de las membranas (Jahn y Scheller, 2006). En este contexto, debido a que las proteínas SNARE median la fusión homotípica de vesículas con bicapa durante el tráfico celular, se propusieron como candidatas para la fusión de las LDs (Olofsson *et al.*, 2011). De hecho, en estudios llevados a cabo en células NIH 3T3, el silenciamiento de genes que codifican SNAP23, sintaxina 5 y VAMP4 disminuyó el índice de fusión de las LDs (Boström *et al.*, 2007). Además, otro estudio realizado en adipocitos mostró que la disminución de la formación de complejos SNARE reducía la incorporación de TAGs en las LDs, probablemente debido a la inhibición de la fusión de las LDs, lo que en última instancia provocaría una disminución en el tamaño de los adipocitos (Millership *et al.*, 2013). Sin embargo, estos resultados aún están en controversia ya que otro trabajo en células S2 de *Drosophila*, muestra que el silenciamiento de SNAP23 no afecta al tamaño de medio de las LDs (Krahmer *et al.*, 2011).

1.3.2.5. Proteínas Rab GTPasas

Todos los estudios proteómicos realizados hasta el momento de LDs aisladas a partir de diferentes tipos celulares han demostrado de forma consistente la presencia de diferentes miembros de la familia de GTPasas de bajo peso molecular Rab en su cubierta (Brasaemle *et al.*, 2004; Ding *et al.*, 2012; Beilstein *et al.*, 2013). En particular, de las 66 proteínas Rab diferentes identificadas en humano (Pfeffer, 2013; Colicelli, 2004; Zerial y McBride, 2001), se ha descrito un total de 19 proteínas Rab distintas asociadas a la superficie de las LDs, en adipocitos y otros tipos celulares que pueden acumular gotas lipídicas (células HepG2, células CHO cultivadas en presencia de ácidos grasos): Rab1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 14, 18, 19, 21, 24, 33, 34, 35, 39 y 41 (Brasaemle *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2005; Ozeki *et al.*, 2005). No obstante, se han encontrado diferencias en cuanto a los miembros de la familia Rab asociados a las LDs en función de las condiciones experimentales testadas y/o de las líneas celulares empleadas en dichos estudios, lo que sugiere que estas proteínas son reclutadas a las LDs bajo diferentes condiciones. Entre todas ellas, Rab 1, Rab5, Rab7 y Rab18 han sido identificadas en más de 4 escrutinios (revisado en Hodges y Wu, 2010). En el apartado siguiente se detallan las características generales, regulación y funciones de las proteínas Rab.

1.4. Rab GTPasas

Las proteínas Rab, pertenecientes a la superfamilia de GTPasas monoméricas Ras, se localizan en subcompartimentos celulares específicos y están destinadas a controlar pasos concretos del tráfico intracelular de membranas (Fig. 5). Aunque, como en el caso de las LDs, se pueden encontrar varias proteínas Rab asociadas a un mismo orgánulo, estas proteínas siempre están segregadas en microdominios espacio-temporales específicos (Sönnichsen *et al.*, 2000). Por ejemplo, estudios realizados en células vivas han permitido mostrar que Rab4, Rab5 y Rab11 ocupan dominios singulares de membrana en el compartimento endosomal (Sönnichsen *et al.*, 2000), y que Rab7 y Rab9 definen microdominios diferentes en endosomas tardíos (Barbero *et al.*, 2002). De esta forma, se ha propuesto que los compartimentos celulares consistirían en mosaicos de proteínas Rab concretas, reclutadas a partir de proteínas efectoras específicas, que actuarían de forma cooperativa para generar entornos particulares y definidos en las membranas celulares (Sönnichsen *et al.*, 2000).

su reclutamiento hacia las zonas de evaginación en el compartimento donador y definiendo en última instancia la identidad de la vesícula de nueva formación (Angers y Merz, 2011). Las proteínas Rab también confieren especificidad en el direccionamiento correcto de las vesículas de transporte hacia el compartimento aceptor mediante su interacción, directa o indirecta, con motores moleculares, facilitando el reclutamiento de éstos hacia la superficie de las vesículas e incluso modulando el movimiento (*processivity*) del motor molecular a lo largo de la red del citoesqueleto (Echard *et al.*, 1998; Hammer y Wu, 2002; Jordens *et al.*, 2001; Kuroda y Fukuda, 2005). Finalmente, las proteínas Rab GTPasas también participan en los eventos de amarre, anclaje y fusión de membranas. Así, se asocian con proteínas v-SNARE y/o t-SNARE para formar los complejos *trans*-SNARE y organizar microdominios competentes para la fusión de membranas sobre la membrana aceptor (Wickner y Schekman, 2008). Además de las funciones relacionadas con la dinámica vesicular, las proteínas Rab también actúan como intermediarios en la integración de señales extracelulares en la maquinaria molecular responsable del tráfico intracelular de membranas (Miaczynska *et al.*, 2004; Clague y Urbé, 2001).

Las proteínas Rab actúan como interruptores moleculares, ya que alternan entre un estado activo, en el que la GTPasa está asociada a GTP, lo que permite su interacción con el compartimento diana, y un estado inactivo, en el que la proteína se encuentra unida a GDP y localizada en el citosol (Pfeffer, 2005; Pfeffer y Aivazian, 2004; Seabra y Wasmeier, 2004).

La estructura terciaria de las proteínas Rab es muy similar a la estructura de otras GTPasas de la familia Ras y consiste en un barril central compuesto por 6 hojas β rodeadas de 5 hélices α . Una de estas hélices α (hélice $\alpha 1$), una región ampliamente conservada en todas las proteínas que hidrolizan GTP (Ostermeier y Brunger, 1999), incluye la “plataforma de unión de GTP” y un elemento de unión a Mg^{2+} , el cofactor necesario para la unión de GTP a la GTPasa con alta afinidad y para su posterior hidrólisis (Vetter y Wittinghofer, 2001). La región de mayor divergencia evolutiva entre las proteínas Rab, el denominado “dominio hipervariable”, que se encuentra en el dominio COOH terminal, se considera que es responsable, al menos en parte, de la especificidad de la unión de proteínas Rab a sus correspondientes membranas diana (Chavrier *et al.*, 1991; Ali *et al.*, 2004, Stenmark *et al.*, 1994). Esta idea se planteó por primera vez con la generación de una proteína híbrida que contenía los 166 residuos aminoacídicos del extremo NH_2 -terminal de Rab2, que se localiza en el compartimento intermedio RE-Golgi (ERGIC), unidos bien a los 35 aminoácidos del extremo COOH-terminal de Rab5, que se dirige a endosomas tempranos, o a los últimos 35

aminoácidos del extremo COOH-terminal de Rab7, que se une específicamente a endosomas tardíos. Así, mediante fraccionamiento subcelular se mostró que las sustituciones de los extremos COOH eran suficientes para dirigir la proteína quimera Rab2/Rab5 y Rab2/Rab7 a endosomas tempranos o tardíos, respectivamente (Chavrier *et al.*, 1991). Sin embargo, estudios posteriores han sugerido que el mecanismo responsable de la especificidad de la unión de proteínas Rab a sus correspondientes membranas diana es más complejo y no sólo es dependiente del dominio hipervariable, sino que otras regiones fuera de este dominio también son determinantes (Ali *et al.*, 2004; Stenmark *et al.*, 1994). Una característica común del dominio hipervariable de todas las proteínas de la familia Rab es la presencia en éste de una modificación post-traduccional consistente en la adición covalente de uno o dos grupos isoprenoides geranilgeranilo (20 carbonos), la cual es necesaria para el anclaje de dichas proteínas a las membranas celulares (Leung *et al.*, 2007). Esta modificación lipídica está catalizada por la acción enzimática de la proteína Rab geranilgeranil transferasa (RGGT) y para que ocurra, las proteínas Rab deben encontrarse formando complejos con una proteína accesoria conocida como *Rab escort protein* (REP) (Farnsworth *et al.*, 1994). Se han propuesto dos posibles modelos de prenilación de las proteínas Rab, que postulan bien la unión de las Rab recién traducidas a REP y el reconocimiento posterior de este complejo por RabGGT o la formación previa de un complejo entre RabGGT y REP que se uniría a la proteína Rab concreta. En cualquiera de ellos, después de la adición de los motivos geranilgeranilo, RabGGT se disociaría de REP/Rab y REP escoltaría a la proteína Rab prenilada hacia su membrana diana (Alexandrov *et al.*, 1994; Andres *et al.*, 1993; Thoma *et al.*, 2001a; Thoma *et al.*, 2001b). Las proteínas Rab mono-geranilgeraniladas (Rab8, Rab13, Rab18, Rab23 y Rab38) necesitan un paso adicional de procesamiento antes de ser dirigidas a sus membranas diana, consistente en la adición de un grupo metil-carboxilo en la cisteína prenilada gracias a la acción secuencial de dos metiltransferasas localizadas en la membrana del RE (Leung *et al.*, 2007). En el caso de las proteínas Rab di-geranilgeraniladas, aunque también necesitan ser metiladas para su correcto direccionamiento, sólo es necesaria una metiltransferasa de RE para catalizar esta reacción (Leung *et al.*, 2007).

Una vez que las proteínas Rab han adquirido el grupo lipídico que les permitirá asociarse a membrana, estas GTPasas son funcionales y pueden ciclar entre los estados de activación y desactivación. La activación de las proteínas Rab mediante su intercambio de GDP por GTP promueve el cambio conformacional de la estructura terciaria de estas proteínas, definiendo su especificidad (Pfeffer, 2013). Este

intercambio de nucleótidos está catalizado por factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (*i.e.* *GDP/GTP exchange factors*, GEFs) que debilitan la interacción de GDP con la proteína Rab y facilitan así su liberación y la consecuente unión de GTP (Vetter y Wittinghofer, 2001), lo que conlleva su activación y unión a proteínas efectoras que se encargarán de traducir la función de la proteína Rab en la organización del sistema de endomembranas. Con respecto a la desactivación de las proteínas Rab, a pesar de ser GTPasas, presentan una capacidad reducida para hidrolizar GTP y, en general, requieren la ayuda de un grupo de proteínas conocidas como proteínas activadoras de GTPasas (*i.e.* *GTPase-activating proteins*, GAPs) para acelerar y hacer eficiente este proceso. Finalmente, otras proteínas que juegan papeles importantes en la modulación de la actividad de las proteínas Rab son las denominadas *Rab GDP dissociation inhibitor* (*i.e.* RabGDI), que previenen la liberación de GDP, estabilizando a la proteína Rab en su forma inactiva, mientras que los *GDI displacement factors* (*i.e.* GDF) reconocen a complejos Rab-RabGDI específicos y promueven la liberación de GDI y la unión subsiguiente de GEF a la proteína Rab (Pfeffer y Aivazian, 2004). El ciclo de activación y desactivación de las proteínas Rab se representa en la Fig. 7.

Entre la larga lista de Rab GEFs descubiertos hasta el momento, los ejemplos clásicos son el complejo TRAPP y la proteína Sec2p que actúan como GEFs en la ruta secretora (Wang *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2000; Walch-Solimena *et al.*, 1997). Concretamente, TRAPP-I promueve la activación de Ypt1p (Rab1 en mamíferos) en la superficie vesicular para el transporte entre RE y Golgi (Sacher *et al.*, 2008), mientras que TRAPP-II facilita la acción de Rab1 en eventos de tráfico post-Golgi. Así, las dos formas de TRAPP parecen regular el anclaje de Rab1 tanto en el tráfico anterógrado mediado por COPII como en el retrógrado dirigido por vesículas COPI. Otras proteínas GEF son Ric1p/Rgp1p, que activan la proteína Rab Yptp6 (Rab6 en mamíferos) y juegan un papel en el reciclado de componentes de la maquinaria exocítica desde endosomas hasta su vuelta a Golgi para su reutilización (Siniosoglou *et al.*, 2000), y Crag, que permite el tráfico de rodopsinas desde la red *trans* del aparato de Golgi hasta los dominios de membrana en los que se acumulan los fotorreceptores en *Drosophila*, el rabdómero, mediante la activación del transporte vesicular dependiente de Rab11 (Xiong *et al.*, 2012).

Por su parte, todas las proteínas GAP comparten el dominio TBC1 (de Tre-2, Bub2p y Cdc16p), que determina la interacción entre estas proteínas con proteínas reguladoras concretas. Además, su actividad está estrictamente regulada por interacciones con proteínas y lípidos reguladores, segundos mensajeros y

modificaciones post-traduccionales, lo que pone de manifiesto su importancia en la coordinación de la respuesta celular mediada por proteínas Rab (Barr y Lambright, 2010). Un ejemplo es TBC1D20, una proteína transmembrana cuya localización está restringida al RE y, por ello, sólo puede unirse a Rabs presentes en este compartimento (De Antoni *et al.*, 2002; Haas *et al.*, 2007). Por su parte, Gyp1p es una proteína periférica de membrana localizada en el aparato de Golgi que actúa sobre la proteína Rab de levaduras Yptp1 (Du y Novick, 2001).

En cuanto a GDI, sólo se han identificado dos isoformas en células humanas: RabGDI1 (RabGDI α), cuya expresión está restringida al tejido nervioso, y RabGDI2 (RabGDI β), expresada de manera ubicua (Alory y Balch, 2001). Ambas isoformas contienen en su estructura un bolsillo hidrofóbico que alberga los grupos prenilo que anclan las Rabs a membrana. Por otra parte, las dos proteínas reconocen a Rabs asociadas a GDP y las extraen de las membranas de destino para devolverlas a su membrana de origen tras un evento de transporte vesicular. Este proceso también permite corregir errores en el direccionamiento de las Rabs. Las proteínas GDI presentan regiones con elevada homología de secuencia con las proteínas REP y, de hecho, comparten con éstas su afinidad por proteínas Rab inactivas. No obstante, estas últimas sólo interactúan con las formas no preniladas de proteínas Rab-GDP, mientras que las RabGDI presentan alta afinidad por las formas preniladas (Goody *et al.*, 2005).

El último grupo de proteínas reguladoras de la actividad de las Rab lo constituyen las *GDI displacement factor* (i.e., GDF). La primera GDF que fue identificada en levaduras pertenece a la familia de proteínas Yip, Yip1, e interactúa con las proteínas Rab Ypt1 e Ypt31 (Yang *et al.*, 1998). Todos los miembros de la familia Yip son proteínas transmembrana cuyos dominios COOH-terminal y NH₂-terminal están orientados hacia el citosol (Calero y Collins, 2002; Calero *et al.*, 2002). Se ha propuesto que una misma GDF podría interactuar con varias proteínas Rab (Pfeffer y Aivazian, 2004). En la Fig. 7 se muestra un resumen de los factores encargados de la regulación de la actividad de las GTPasas Rab.

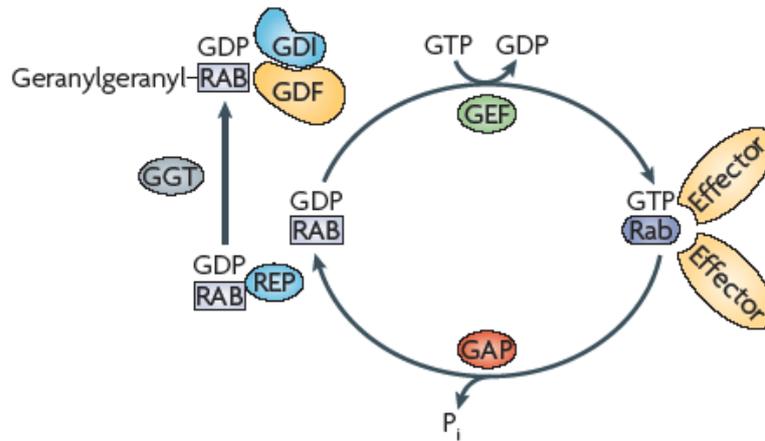


Figura 7. Ciclo de activación de las Rab GTPasas. Las proteínas Rab alternan entre un estado inactivo en el que se encuentran unidas a GDP y otro activo, caracterizado por su unión a GTP y su asociación a la membrana diana. En este proceso están implicadas las proteínas reguladoras: *Rab escort protein* (REP), Rab geranylgeranyl transferasa (GGT), *GDI displacement factors* (GDF), intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEF), proteínas activadoras de GTPasas (GAP) y proteínas inhibidoras de disociación de GDP (GDI).

Dos artículos muy recientes muestran la importancia de todos los reguladores descritos para la correcta distribución de las Rab GTPasas (Gerondopoulos *et al.*, 2012; Blümmer *et al.*, 2013). Así, se ha observado que la deslocalización del GEF de Rab5, Rabex-5, desde endosomas tempranos a mitocondrias, provoca la redistribución de Rab5 también hacia mitocondrias (Blümmer *et al.*, 2013), lo que sugiere que el GDI de Rab5 lo dirige hacia las mitocondrias donde es estabilizado tras la activación de Rabex-5. Presumiblemente, una vez unido a mitocondria, Rab5-GTP tendría la capacidad de reclutar los efectores de Rab5 hacia allí. De manera similar, el anclaje de las GEF de Rab32/Rab38 a mitocondria produce la relocalización de Rab32 en este orgánulo (Gerondopoulos *et al.*, 2012). Estos avances confirman trabajos previos que demuestran la importancia de las interacciones de los efectores de las Rab en la estabilización de Rab GTPasas en compartimentos específicos de membrana (Aivazian *et al.*, 2006). Mediante la activación de una proteína Rab en una localización de membrana particular, la GTPasa se hace resistente a su eliminación por GDI y es también capaz de unirse a efectores que la estabilizan aún más. Así, se ha descrito que el mutante constitutivamente activo de Rab5 pierde su localización en membrana con menor frecuencia que la versión silvestre (Blümmer *et al.*, 2013). Estas y otras observaciones han llevado a sugerir que los efectores reclutados por las formas activas de las GTPasas Rab contribuyen a la localización de estas proteínas, además de ser fundamentales para ejecutar su función (Grosshans *et al.*, 2006).

De hecho, y como se ha mencionado con anterioridad, las proteínas efectoras son las últimas responsables de traducir la función específica de las proteínas Rab (Stenmark, 2009). Cada proteína Rab es capaz de reclutar a un conjunto de proteínas efectoras en la superficie de las membranas y de ensamblar la maquinaria molecular apropiada para mediar la interacción o fusión de membranas o la unión a proteínas motoras específicas. Tras la unión a una proteína Rab activada, los efectores pueden contribuir directamente a su localización limitando su difusión en la membrana o de forma indirecta bloqueando la inactivación de la GTPasa. Existen diferentes tipos de moléculas efectoras, que incluyen desde adaptadores, factores de amarre, quinasas, fosfatasas y proteínas motoras (Stenmark, 2009). Así, el efector de Rab5, EEA1, actúa como factor de amarre para la proteína SNARE, sintaxina-13, en el proceso de fusión homotípica de endosomas tempranos (Grosshans *et al.*, 2006). Entre los efectores que funcionan como proteínas adaptadoras a proteínas motoras se encuentra la melanofilina, efector de Rab27 (Bahadoran *et al.*, 2001). El reclutamiento de la melanofilina por Rab27 a las membranas de los melanosomas conecta los melanosomas a miosina Va. A continuación, la miosina Va dirige a las vesículas que contienen Rab27 hacia la periferia celular. Otro efector de Rab27, la proteína *synaptotagmin-like protein 2* (SYTL2), es reclutada después de melanofilina para mediar la distribución periférica correcta de los melanosomas (Kuroda y Fukuda, 2004). Otro ejemplo es Rab11FIP2, que asocia las vesículas positivas para Rab11A a miosina Vb. Curiosamente, la miosina Vb también funciona como efector directo de Rab8A y Rab11A en la ruta endocítica de reciclaje (Hales *et al.*, 2002; Roland *et al.*, 2007). Las quinesinas también pueden ser efectores tanto directos como indirectos de las Rab, así, la quinesina KIF20A interacciona directamente con Rab6 mientras que KIF16B se asocia a PIP3, y de forma indirecta, a Rab5 (Horgan y McCaffrey, 2011).

La caracterización de proteínas efectoras que presentan capacidad de unión a dos proteínas Rab diferentes ha revelado el potencial de estos efectores para unir unos microdominios de Rab a otros. Como es el caso de la proteína GCC185, que se localiza en las membranas del aparato de Golgi gracias a las interacciones cooperativas que establece entre Rab6 y la GTPasa *ADP-ribosylation factor-like protein 1* (ARL1) (Burguette *et al.*, 2008). Además de unirse a estas GTPasas, GCC185 contiene sitios de unión para otras proteínas Rab, incluyendo a Rab1, Rab2, Rab9, Rab15, Rab27B, Rab30 y Rab33B (Hayes *et al.*, 2009).

De esta forma, cada proteína Rab es capaz de asociarse a varios efectores diferentes que, juntos, traducen la señal de las GTPasas para modular distintos procesos asociados con el transporte de membranas. En particular, se ha establecido

que Rab1 se localiza en las zonas de salida del RE y en el ERGIC y media el tráfico vesicular entre el Golgi y el RE. Rab2 se encuentra en el ERGIC y, al igual que Rab1, podría participar en el control del tráfico entre el Golgi y el RE. Las proteínas Rab asociadas al aparato de Golgi, Rab6, Rab33 y Rab40, median el tráfico intra-Golgi. Rab33, junto con Rab24, también regula la formación de autofagosomas. Rab8 media el tráfico vesicular correspondiente a la ruta de secreción constitutiva entre la red *trans* del Golgi y la membrana plasmática y también participa en la translocación del transportador de glucosa, GLUT4, a la superficie celular (junto con Rab10 y Rab14) y en la formación de cilios (junto con Rab17 y Rab23). Rab3, Rab26, Rab27 y Rab37 participan en el control de diferentes etapas de la ruta de secreción regulada y, en concreto, Rab27 media la translocación de melanosomas a la superficie celular. Rab32 y Rab38 están involucradas en la biogénesis de melanosomas y Rab32 también controla la fisión mitocondrial. Rab13 regula el ensamblado de las uniones estrechas entre células epiteliales. Rab22 media el tráfico vesicular entre TGN y endosomas tempranos. Rab5, localizada en endosomas tempranos, fagosomas, caveosomas y la membrana plasmática, participa en endocitosis, macropinocitosis (junto con Rab34) y en la maduración de endosomas tempranos (con Rab14 y Rab22). Rab21 media la endocitosis de integrinas. Rab11 y Rab35 regulan las fases lentas de la endocitosis de reciclaje, mientras que Rab4 controla las fases rápidas. Rab15 está involucrada en el tráfico entre endosomas tempranos y endosomas de reciclaje y en el tráfico de endosomas de reciclaje desde la membrana apical a las membranas basolaterales. Rab17 y Rab25 controlan el tráfico de endosomas de reciclaje hacia la membrana apical. Rab7 media la maduración de endosomas tardíos y fagosomas y su fusión con lisosomas. Finalmente, Rab9 regula el transporte de endosomas tardíos hacia el TGN (Fig. 5).

En el caso particular de adipocitos, sólo se han llevado a cabo estudios detallados sobre Rab5 y Rab18 (Liu *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2005; Ohsaki *et al.*, 2006; Ozeki *et al.*, 2005). Así, se ha establecido que Rab5 participa en la internalización inducida por insulina de GLUT4 en adipocitos 3T3-L1 gracias a su capacidad para reclutar la proteína motora dineína, facilitando así la interacción de las vesículas que contienen dicho transportador con la red de microtúbulos (Huang *et al.*, 2001). Trabajos más recientes han demostrado que Rab5 también está implicada en el acercamiento de las LDs a los endosomas a través del reclutamiento del factor de amarre asociado a estos orgánulos, EEA1, lo que permite la transferencia de lípidos entre estos dos compartimentos intracelulares (Liu *et al.*, 2007). En cuanto a Rab18, su localización intracelular es fuertemente dependiente del tipo celular considerado. Así

el primer estudio llevado a cabo sobre esta proteína estableció su asociación con endosomas en células epiteliales de riñón (Lutcke *et al.*, 1994), mientras que estudios de microscopía confocal posteriores colocalizaron Rab18 con marcadores de gránulos de secreción en células (neuro)endocrinas PC12, AtT20 y melanotropas (Vazquez-Martinez *et al.*, 2007) y de los compartimentos *cis*-Golgi y RE en fibroblastos NRK, células Vero y células COS7 (Dejgaard *et al.*, 2008). En conjunto, estas observaciones sugieren que esta GTPasa puede cumplir distintas funciones que dependen del tipo celular y de su posible interacción con proteínas efectoras diferentes. No fue hasta 2005 cuando dos grupos de investigación independientes demostraron la asociación de Rab18 a las LDs en adipocitos y otros tipos celulares que contienen LDs, incluyendo hepatocitos HepG2 (Martin *et al.*, 2005; Ozeki *et al.*, 2005). Estos estudios mostraron la asociación de Rab18 a la superficie de las LDs, especialmente en condiciones de sobreexpresión de esta GTPasa (Ozeki *et al.*, 2005) o tras la estimulación de la lipólisis inducida por isoproterenol a través de la activación de receptores β -adrenérgicos (Martin *et al.*, 2005). Estos resultados condujeron a proponer que Rab18 podría participar en el tráfico de lípidos (Martin *et al.*, 2005; Ozeki *et al.*, 2005). Además, se observó que la sobreexpresión de Rab18 provocaba un aumento significativo en la cantidad de membrana de retículo endoplásmico (RE) que rodea a las LDs (Ozeki *et al.*, 2005), por lo que se propuso que esta GTPasa podría mediar la transferencia de lípidos entre estos dos compartimentos (Ozeki *et al.*, 2005). Recientemente, nuestro grupo de investigación ha demostrado que, además de regular la lipólisis, Rab18 también participa en los procesos de síntesis de lípidos inducidos por insulina (Pulido *et al.*, 2011). Así, Rab18 se asocia a la superficie de las LDs en adipocitos 3T3-L1 no sólo en respuesta a la activación β -adrenérgica inducida por isoproterenol, sino también en respuesta a insulina. Además, la sobreexpresión de Rab18 en células 3T3-L1 provoca un aumento del contenido en TAGs y del tamaño de las LDs, lo que indica que Rab18 podría facilitar la acumulación de lípidos mediada por insulina en las LDs. Además, estudios de expresión en tejido adiposo procedente de pacientes con distinto grado de obesidad y/o sensibilidad a insulina (Pulido *et al.*, 2011) y de diversos modelos murinos de obesidad (genética o inducida por dieta; Pulido *et al.*, 2013) han permitido mostrar que la expresión de Rab18 incrementa en relación al aumento de masa grasa, lo que apoyaría su papel en la adaptación de la función de los adipocitos a esta condición.

1.5. Interacción de las LDs con otros orgánulos celulares

Actualmente se acepta que las LDs son orgánulos altamente dinámicos. Así, por una parte, además de su asociación con proteínas reguladoras del tráfico intracelular, se ha demostrado la interacción de las LDs con diversos elementos del citoesqueleto, tanto mediante aproximaciones proteómicas como a través de análisis específicos dirigidos a definir dicha interacción (Zehmer *et al.*, 2009; revisado en Beller *et al.*, 2010). Por otra parte, está claramente establecido que las LDs interactúan con otros orgánulos celulares, incluyendo el RE (Fujimoto *et al.*, 2008; Murphy *et al.*, 2009; revisado en Goodman, 2008; Pol *et al.*, 2014), las mitocondrias y los peroxisomas (Cohen *et al.*, 2004; Novikoff *et al.*, 1980; Blanchette-Mackie *et al.*, 1995). Además, también se ha propuesto una interacción transitoria entre los endosomas y las LDs (Martin *et al.*, 2005).

1.5.1. Citoesqueleto

Estudios dinámicos en células vivas han permitido demostrar que las LDs son estructuras móviles que interactúan con el citoesqueleto (Spandl *et al.*, 2009). Concretamente, se ha establecido que exhiben movimientos bidireccionales rápidos en relación con el citoesqueleto de microtúbulos en un proceso que parece estar mediado por las proteínas motoras dineína y quinesina (Martin y Parton 2006; Spandl *et al.*, 2009) cuya localización en las LDs fue determinada por co-inmunoprecipitación con ADRP (Boström *et al.*, 2005) y mediante inmunofluorescencia (Gross *et al.*, 2000). De hecho, la fosforilación de dineína mediada por Erk (Andersson *et al.*, 2006) incrementa la asociación de esta proteína motora con las LDs. Además, el movimiento de las LDs parece ser esencial para la biogénesis de estos orgánulos, ya que se ha demostrado que la inhibición de dineína bloquea su crecimiento (Zehmer *et al.*, 2009; Welte, 2009). Sin embargo, otros estudios en adipocitos 3T3-L1 han observado que la disrupción de microtúbulos en este tipo celular no altera la morfología de las LDs (Murphy *et al.*, 2010).

También se ha propuesto un papel del citoesqueleto de actina para el correcto desarrollo y acumulación de las LDs durante el proceso de adipogénesis (Yang *et al.*, 2013). De hecho, la actina sufre un importante proceso de remodelado durante la diferenciación de los adipocitos. Concretamente, en preadipocitos la actina se organiza en forma de fibras de estrés que se distribuyen por todo el citoplasma, también en torno a las LDs en formación. A medida que prosigue la diferenciación (día 3 en adipocitos 3T3-L1), se produce el desensamblaje de las fibras en la región central de la

célula, especialmente en las zonas de formación de LDs y, posteriormente, los filamentos de actina desaparecen del centro celular para distribuirse en el córtex celular (Yang *et al.*, 2013). Se ha propuesto que el remodelado de la actina es necesario para que tenga lugar la formación de las LDs durante la adipogénesis, probablemente controlando la fusión y expansión de estos orgánulos. Concretamente, se ha sugerido que una proteína asociada al RE y cuya mutación provoca lipodistrofia, seipin, a través de su interacción con la proteína de andamiaje, 14-3-3 β , permite la localización de la proteína cofilina-1 que, mediante su función de despolimerización de los filamentos de actina, produciría el desensamblaje de las fibras de estrés que rodean a las LDs en formación (Yang *et al.*, 2013). En esta línea, se ha demostrado que el tratamiento de células madre embrionarias de ratón con citocalasina D, que se une a los filamentos de actina inhibiendo su polimerización y elongación, o de adipocitos 3T3-L1 con latrunculina B, que secuestra los monómeros de actina impidiendo su polimerización, promueven la adipogénesis en estas células (Feng *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2013). Curiosamente, el citoesqueleto cortical de actina no parece influir de forma directa en el crecimiento de las LDs en respuesta a la presencia de ácidos grasos (i.e., lipogénesis) (Yang *et al.*, 2013). Por el contrario, se ha propuesto que la actina cortical regula la localización de GLUT4 en la membrana plasmática en respuesta a insulina, controlando con ello la captación de glucosa (López *et al.*, 2009). En este contexto, se ha propuesto igualmente un papel de la actina cortical en el mantenimiento y función de las caveolas (Ritcher *et al.*, 2008), que constituyen tanto plataformas de señalización de la insulina como puntos de transporte de ácidos grasos (revisado en Frühbeck *et al.*, 2007).

Finalmente, la formación de las LDs también está influenciada por el citoesqueleto de vimentina, que durante la adipogénesis se organiza formando redes (*cage-like*) alrededor de estos orgánulos (Lieber y Evans, 1996; Heid *et al.*, 2014). De hecho, tanto el desensamblaje como la agregación de los filamentos de vimentina al inicio o en las primeras fases de la adipogénesis reducen de manera significativa el contenido de LDs en células 3T3-L1 (Lieber y Evans, 1996). Recientemente se ha demostrado que vimentina co-inmunoprecipita con PLIN, lo que ha llevado a sugerir la existencia de una interacción directa entre estas dos proteínas en la proximidad de las LDs que favorecería el acercamiento mediado por vimentina de las cisternas del RE a las LDs en formación, facilitando así su crecimiento (Heid *et al.*, 2014).

1.5.2. Retículo Endoplásmico

El RE es un sistema dinámico de membranas conectadas que está organizado en microdominios especializados en funciones como la síntesis y secreción de proteínas y lípidos, el control de calidad de proteínas o la detoxificación. A pesar de la continuidad física existente entre estos microdominios, existen mecanismos selectivos que permiten una separación funcional entre los mismos (revisado en Pol *et al.*, 2014). De hecho, se ha propuesto que en uno de estos dominios podría llevarse a cabo la acumulación de lípidos neutros previa a la formación de las LDs. En este sentido, se pueden observar cisternas de RE que mantienen contactos directos con las LDs (Levi, 2010; Holthuis *et al.*, 2005), lo que ha sido corroborado en estudios posteriores de tomografías 3D de LDs en formación (Kassan *et al.*, 2013). Esta interacción se conserva en todas las células en las que están presentes las LDs, desde levaduras hasta mamíferos (Szymanski *et al.*, 2007; Novikoff *et al.*, 1980; Stemberger *et al.*, 1984). Esta estrecha relación se apoya aún más por la localización en el RE de las enzimas responsables de los últimos pasos de la síntesis de lípidos neutros (Buhman *et al.*, 2001). De hecho, aunque se han propuesto varios modelos para explicar la formación de las LDs, todos ellos coinciden en que este proceso ocurre en asociación con el RE (Wanner *et al.*, 1981; Murphy y Vance, 1999; Zweytick *et al.*, 2000; Wältermann *et al.*, 2005; Ploegh, 2007). La hipótesis prevalente propone que la acumulación de lípidos neutros en el interior de la bicapa lipídica del RE conduce al engrosamiento de ésta y a la formación de una LD naciente en la cara citosólica de la membrana, en un proceso que podría estar dirigido por los lípidos neutros que se acumulan y sobresalen de la membrana, o por factores citosólicos que se unen a la membrana del RE y facilitan la salida actuando como proteínas coatómero (Londos *et al.*, 2005). Entre estos factores se ha propuesto a la familia de proteínas PAT como mediadores de la acumulación de lípidos neutros en dominios especializados del RE. Una variante de este modelo, propone que las LDs nunca se escindirían completamente del RE, manteniéndose en continua conexión física con la cara citosólica del RE (Jacquier *et al.*, 2011). De hecho, se ha propuesto que algunas proteínas, especialmente aquellas que están unidas a membrana, podrían difundir a través de dichos puentes desde el RE hasta la superficie de las LDs (Walther y Farese, 2012). En otros casos, se propone que algunas de las proteínas de la cubierta, como la ATGL, podrían llegar a las LDs vía vesicular mediada por ARF/COPI procedente de los sitios de salida del RE (*ER exit sites*), aunque se desconoce el mecanismo que permitiría transferir las proteínas desde dichas vesículas a las LDs.

Según un modelo alternativo de formación de LDs, éstas se separarían de ambas membranas del RE como una bicela (Ploegh, 2007). Una de las características más atractivas de este último modelo es el hecho de que el proceso de escisión podría mediar la salida de proteínas del RE destinadas a la degradación (ERAD) por el proteasoma, implicando de esta forma un nexo funcional entre la formación de las LDs y la degradación proteica (Ploegh, 2007). Este mecanismo también permitiría explicar cómo los virus escapan del lumen del RE al citosol en forma de grandes partículas ensambladas. El tercer modelo propuesto defiende que las LDs se formarían inicialmente en pequeñas vesículas con bicapa a través de la maquinaria de formación de vesículas de la ruta secretora, lo que ocurriría en un dominio especializado del RE dedicado a las síntesis lipídica, distinto del destinado a transporte vesicular (Robenek *et al.*, 2004). En este escenario, se formaría una vesícula naciente que permanecería asociada a la membrana del RE. Los lípidos neutros podrían rellenar la vesícula mientras ésta se encuentra en continuidad con el RE o tras su escisión, vía vesicular. Cualquiera de estos procesos podría rellenar gradualmente el espacio intermembrana hasta un punto en que el lumen vesicular desaparece o sólo constituye una pequeña parte de la LD. El lumen residual de la vesícula podría fusionarse con la cubierta de la LD o permanecer como una inclusión de material acuoso dentro de ella. Esta última posibilidad podría explicar la identificación de proteínas hidrofílicas en el núcleo de las LDs (Robenek *et al.*, 2005) (Fig. 8).

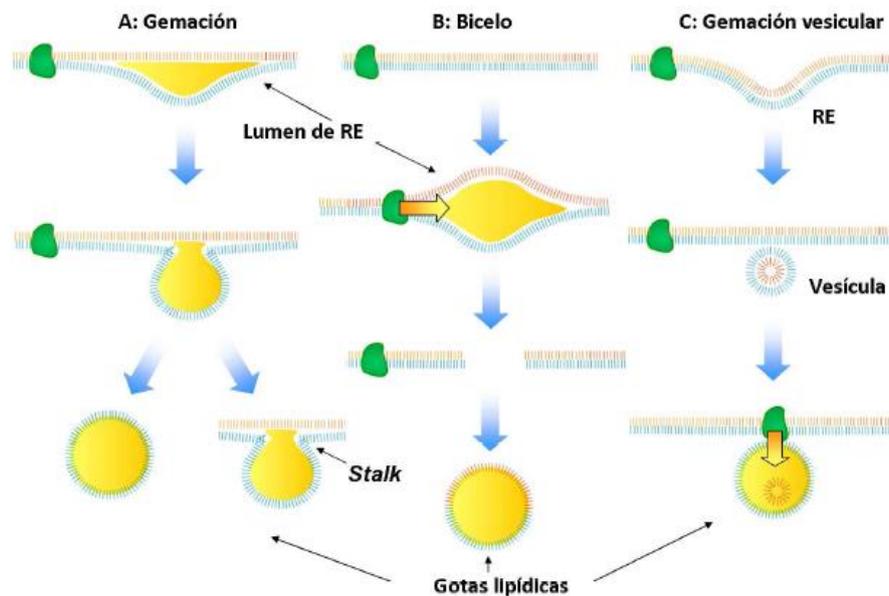


Figura 8. Formación de las LDs. Las LDs se forman a partir de zonas especializadas del RE donde se acumulan los TAGs. La formación de las gotas se puede realizar por gemación a partir de una de las hemicapas de la membrana del RE (A), de la escisión de ambas hemicapas (B) o bien, a partir de la carga de TAGs en una vesícula (C). Tomado de Tesis Pulido, 2010.

A pesar los descubrimientos realizados respecto a la formación de las LDs a partir del RE, aún queda pendiente de establecer cómo se forma una monocapa a partir de una bicapa lipídica. Debido a que las enzimas de síntesis de lípidos neutros residen en el RE, los productos de estas enzimas deberían ocupar el espacio entre las dos membranas de la bicapa, formando una lente de lípidos neutros. Estudios *in vitro* con microsomas de RE de girasol (*Helianthus annuus*) observaron la formación de pequeñas lentes líquidas de unos 60 nm de diámetro en la bicapa del RE que, de forma similar a las LDs, contienen TAGs y reclutan oleosinas (Lacey *et al.*, 1999). Sin embargo, se desconoce cómo los lípidos neutros se organizan en LDs nacientes, si ocurre en localizaciones específicas en el RE o si son proteínas específicas las que están implicadas. En células de mamíferos, TIP47 es reclutada al RE durante el almacenamiento lipídico (Skinner *et al.*, 2009) por lo que se sugiere su implicación en la formación de LDs. Sin embargo, muchos organismos (i.e. levaduras) no tienen ortólogo de TIP47 y muchos tipos celulares no la expresan (i.e. células S2 de *Drosophila*), por lo que este mecanismo por sí solo no podría ser responsable de la formación de LDs.

1.5.3. Mitocondrias

Las mitocondrias catalizan la β -oxidación de ácidos grasos de cadena media y larga derivados de la dieta (o procedentes de la oxidación de ácidos grasos de cadena muy larga en peroxisomas) para obtener acetil-CoA, que es utilizado para la producción de ATP y como sustrato de reacciones anabólicas (Schrader y Yoon, 2007).

Las LDs se han observado frecuentemente asociadas a mitocondrias en adipocitos (Novikoff *et al.*, 1980; Blanchette-Mackie y Scow, 1983), hepatocitos (Kalashnikova y Fadeeva, 2006) y células musculares (Shaw *et al.*, 2008), en las que esta interacción incrementa cuando aumenta el requerimiento energético debido al ejercicio físico (Tarnopolsky *et al.*, 2007). Se cree que esta asociación permite la transferencia directa de ácidos grasos desde las LDs a las mitocondrias, donde serían utilizados para la obtención de energía por β -oxidación, lo que es especialmente relevante en músculo (Vock *et al.*, 1996). En esta misma línea, se ha demostrado que la interacción entre mitocondrias y LDs en adipocitos se incrementa durante la lipólisis (Tarnopolsky *et al.*, 2007). En particular, se ha demostrado que el ayuno incrementa la actividad de la enzima encargada del transporte de ácidos grasos hacia la matriz mitocondrial, CPT-1 (Zhang *et al.*, 2005). Además, se ha observado que una disminución del ATP intracelular en adipocitos blancos inducida por desacoplantes

mitocondriales o inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial puede inhibir la lipólisis estimulada por catecolaminas (Guilherme *et al.* 2008; Pardo *et al.* 2011; Medina-Gomez, 2012).

Otro propósito de la interacción entre LDs y mitocondrias podría ser el tráfico de lípidos, ya que en levaduras, donde los peroxisomas son los únicos orgánulos implicados en la oxidación de ácidos grasos, también existen asociaciones claras entre LDs y mitocondrias. Así, se han encontrado muchas proteínas mitocondriales localizadas en LDs (Binns *et al.*, 2006). Estos descubrimientos indican que la interacción entre LDs y mitocondrias puede estar involucrada en múltiples eventos fisiológicos no sólo relacionados con la oxidación de ácidos grasos. De hecho, tanto en tejido adiposo como en hígado, las mitocondrias juegan un papel fundamental en la lipogénesis proporcionando intermediarios clave para la síntesis de TAGs. El ciclo de Krebs proporciona, mediante reacciones anapleróticas, los sustratos necesarios para la síntesis de ácidos grasos (i.e. citrato) (Owen *et al.*, 2002; Franckhauser *et al.*, 2002). Por su parte, el glicerol-3-fosfato (G3P) sintetizado a partir del piruvato vía gliceroneogénesis es esterificado y acilado, tanto en el RE como en la mitocondria, para dar dos intermediarios de la síntesis de TAGs, ácido lisofosfatídico (LPA) y ácido fosfatídico (PA) aunque en éste último caso, tras su producción, este intermediario es transportado al RE antes de ser utilizado para la síntesis de TAGs. Además, la generación de acetil-CoA para la síntesis de ácidos grasos antes de su esterificación en TAGs requiere de la participación de las mitocondrias, la activación de los ácidos grasos de cadena media ocurre en la matriz mitocondrial y la síntesis de fosfolípidos se lleva a cabo en la membrana externa mitocondrial. Estos resultados sugieren, en conjunto, que la capacidad lipogénica está condicionada al menos en parte por la función mitocondrial. En este contexto, se ha establecido que las mitocondrias juegan un papel fundamental en el crecimiento de las LDs durante la adipogénesis (Ducluzeau *et al.*, 2011), un proceso que está asociado con un incremento de la masa mitocondrial (Bogacka *et al.*, 2005; Rosen *et al.*, 2006). Se ha descrito además que, durante la adipogénesis, se produce un incremento en el desacoplamiento de la actividad respiratoria así como la fragmentación de la red mitocondrial, adquiriendo entonces una distribución punteada alrededor de la superficie de las LDs. Este proceso de fisión es esencial para una correcta acumulación de lípidos. El incremento coordinado de genes implicados en la β -oxidación de ácidos grasos y la producción de ROS argumentan a favor de un mecanismo estrictamente controlado y especializado que permite la lipogénesis y expansión de las LDs (Ducluzeau *et al.*, 2011). Existen bastantes evidencias experimentales que apoyan que tanto la obesidad como la

lipodistrofia concurren con importantes alteraciones de la actividad mitocondrial, lo que apoya el papel esencial de las mitocondrias en las complicaciones asociadas a la disfunción del tejido adiposo (Peinado *et al.*, 2011; Medina-Gómez, 2012).

En cuanto al papel de mitocondrias en la síntesis de fosfolípidos, en la membrana interna mitocondrial tiene lugar la biosíntesis de cardiolipina (CL), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG) y PA (Osman *et al.*, 2011; Lagace y Ridgway, 2013). Como se ha mencionado anteriormente, la síntesis de fosfolípidos en las mitocondrias comienza con la acilación en la posición sn-1 de G3P o dihidroxiacetona fosfato (DHAP) por la acción de GPATs. A continuación, las ácido lisofosfatídico aciltransferasas (LPAATs) convierten el LPA en PA, el intermediario central de las dos rutas celulares de síntesis de fosfolípidos, que será metabolizado a DAG para sintetizar PE y PC mediante la ruta de Kennedy, o a CDP-DAG para la producción de PS, PI, PG y CL (Fig. 9).

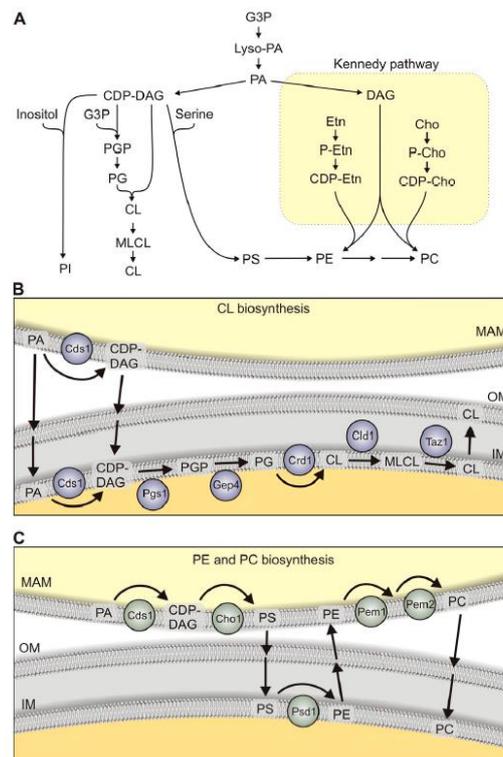


Figura 9. Esquema de la biosíntesis de fosfolípidos en mitocondrias. (A) Esquema de las reacciones necesarias para la formación de fosfolípidos. (B) Biosíntesis de CL en las membranas de RE y mitocondrias. (C) De forma alternativa, PC y PE pueden ser sintetizadas a través de la cascada enzimática de la ruta de Kennedy. Tomado de Osman *et al.*, 2011

Mientras que la CL se sintetiza a partir de CDP-DAG en la membrana interna mitocondrial mediante una cascada de reacciones multienzimáticas, la síntesis de PE y PC en la ruta de Kennedy utiliza como sustrato la PS procedente de dominios

específicos del RE que se encuentran estrechamente asociados a mitocondrias. Esta PS importada del RE es descarboxilada en la membrana interna mitocondrial por acción de la enzima descarboxilasa Psd1, generando PE que es utilizada para la síntesis de la mayoría de los glicerofosfolípidos presentes en las membranas celulares. Su principal destino es el RE, donde se utiliza como sustrato para generar PC mediante una reacción de metilación. Este proceso conlleva el transporte de fosfolípidos entre las membranas del RE y las mitocondrias en regiones especializadas del RE que se encuentran estrechamente asociadas a las mitocondrias (Voelker, 1990; Gaigg *et al.*, 1995) y que, por ello, se denominaron *mitochondria-associated membranes* (MAMs; Vance, 1990; Ardail *et al.*, 1993; Gaigg *et al.*, 1995; Shiao *et al.*, 1995). Estos dominios se caracterizan por estar enriquecidos en ciertos lípidos y enzimas implicadas en la biosíntesis de fosfolípidos (i.e. PS sintasa-1-PSS-1-, *long chain fatty acid-CoA ligase* -FACL4-, aciltransferasa Ale1; PEMT, GPAT1 y acil-CoA sintasa 4 (Vance, 1990; Cui *et al.*, 1993; Stone y Vance, 2000; Pellon-Maison *et al.*, 2007; Lewin *et al.*, 2002). Se ha propuesto que el transporte entre ambos orgánulos, a pesar de ser independiente de ATP, está regulado por ubiquitinación. De hecho se ha identificado una E3 ubiquitin ligasa en el proceso de transporte de PS desde las MAMs hasta las mitocondrias (Schumacher *et al.*, 2002; Voelker, 2009). Sin embargo, evidencias directas en levaduras apoyan la existencia de un puente macromolecular proteico compuesto de las proteínas Mdm10, Mdm34, Mmm1 y Mdm12 (sin aparentes homólogos en mamíferos), denominado complejo ERMES, que permite el transporte de fosfolípidos entre orgánulos (Kornmann y Walter, 2010), ya que la ausencia de componentes individuales de este complejo provoca una disminución de los niveles de PE y PC mitocondriales. Finalmente, destacar que las MAMs también están enriquecidas en enzimas implicadas en la síntesis de TAGs, como DGAT2 (Stone *et al.*, 2009).

1.5.4. Peroxisomas

Los peroxisomas están presentes, en mayor o menor medida, en todas las células. Además de por crecimiento y división de peroxisomas preexistentes, estudios recientes han puesto de manifiesto que estos orgánulos, al igual que las LDs, podrían originarse a partir del RE (Titorenko y Mullen, 2006), lo que podría permitir la biogénesis coordinada de los dos orgánulos en respuesta a estímulos reguladores relacionados con el estado energético de la célula (Titorenko y Mullen, 2006). Al igual que lo observado para las mitocondrias, los peroxisomas se localizan frecuentemente cercanos a las LDs (Novikoff *et al.*, 1980). Incluso se ha descrito la existencia de protrusiones de peroxisomas, denominados pexopodia (o *gnarls*), que se extienden y

penetran en el núcleo de los cuerpos lipídicos de *Saccharomyces cerevisiae* (Binns *et al.*, 2006). Hasta el momento, este tipo de interacción no se ha descrito en otros organismos.

Los peroxisomas están implicados en una importante variedad de rutas metabólicas ligadas al metabolismo lipídico, incluyendo el catabolismo (α y β oxidación) de ácidos grasos de cadena muy larga (>C22) o ramificados, la biosíntesis de éter-fosfolípidos y ácidos biliares y el metabolismo del colesterol (Schrader, 2001). De hecho, los peroxisomas contienen cerca de 60 enzimas implicadas en rutas metabólicas de lípidos (Hunt *et al.*, 2012). En este contexto, se ha propuesto que los contactos LDs-peroxisomas deben facilitar el acoplamiento de la lipólisis en las LDs a la oxidación de los ácidos grasos resultantes en el peroxisoma (Ozeki *et al.*, 2005; Murphy *et al.*, 2009). En los peroxisomas se produce la oxidación de compuestos más complejos que en el caso de las mitocondrias, como ácidos grasos de cadena muy larga, ácidos dicarboxílicos de cadena media y larga, precursores de ácidos biliares, prostaglandinas, leucotrienos y algunos ácidos grasos poli-insaturados. Sin embargo, este proceso de β -oxidación no genera energía, ya que, a pesar de que los peroxisomas contienen la maquinaria enzimática completa para la β -oxidación de ácidos grasos, esta oxidación no es completa y los productos resultantes son transportados a las mitocondrias, donde finaliza su oxidación hasta CO_2 y H_2O . El primer paso en el proceso de oxidación consiste en la activación de los ácidos grasos de cadena muy larga o ramificados gracias a varias enzimas, que incluyen acil-CoA sintetetasas, cuya función es la unión de CoA a los ácidos grasos, y acil CoA oxidasas que reducen los ácidos grasos activados mediante la introducción de un doble enlace entre los carbonos α y β a través de un grupo prostético unido a flavina (FAD) y oxígeno molecular. Esta reacción genera peróxido de hidrógeno (H_2O_2) el metabolito clave de este orgánulo (Faust *et al.*, 2012). Las siguientes reacciones se basan en la enoil-CoA hidratación y la β -hidroxi-acil-CoA deshidrogenación de los ácidos grasos no ramificados y ramificados, respectivamente, dando lugar a la forma β -cetoacil-CoA correspondiente, en reacciones que son catalizadas por las proteínas denominadas “proteínas bifuncionales del peroxisoma”, LBP y DBP. LBP está implicada principalmente en el metabolismo de los ácidos grasos de cadena no ramificada mientras que DBP muestra preferencia por los ácidos grasos de cadena ramificada, como el ácido pristánico y los precursores de los ácidos biliares. A continuación, una tiolasa rompe el β -cetoacil-CoA generando acetil-CoA y reduciendo de esta forma la longitud del ácido graso. El transporte de los ácidos grasos generados hacia las mitocondrias se realiza en forma de ésteres de acilcarnitina por la acción de las

enzimas carnitina O-acetil (octanoil) transferasas CRAT y CROT. Otra de las enzimas que actúa de forma paralela a la β -oxidación es la catalasa, que elimina el H_2O_2 producido a lo largo del proceso (Wanders y Waterham, 2006; Faust *et al.*, 2012). De hecho, los peroxisomas producen una cantidad importante de especies reactivas de O_2 (ROS) y de N_2 (RNS). Además de catalasa, los peroxisomas contienen glutatión peroxidasa y peroxirredoxina V (PMP20), que catabolizan el H_2O_2 generado por la reducción del O_2 por las oxidasas del peroxisoma.

En la α -oxidación se degradan aquéllos ácidos grasos que poseen una ramificación consistente en un grupo metilo en el carbono en posición 3 (Faust *et al.*, 2012) y, por tanto, no pueden sufrir β -oxidación. El catabolismo de estos ácidos grasos conlleva en primer lugar una descarboxilación α -oxidativa para producir el correspondiente ácido graso (n-1) con el grupo metilo en la posición 2, convirtiéndose de esta forma en sustrato de β -oxidación. En mamíferos, la α -oxidación es un proceso estrictamente peroxisomal que sólo acepta como sustratos ésteres de acil-CoA (Faust *et al.*, 2012).

Además de las funciones catabólicas de los peroxisomas, éstos también tienen un papel esencial en la biosíntesis de éter-fosfolípidos, un proceso que llevan a cabo en conjunción con el RE. La síntesis comienza con la asociación de las enzimas exclusivas de peroxisomas, dihidroxiacetona fosfato O-aciltransferasa o DHAPAT (codificada por GNPAT) y alquildihidroxiacetona fosfato sintasa o ADHAPS (codificada por AGPS) en la cara luminal de la membrana peroxisomal. La ausencia de cualquiera de estas dos enzimas conlleva una síntesis de éter-fosfolípidos completamente deficiente (Brites *et al.*, 2004). La reacción inicial consiste en la acilación de la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) en la posición sn-1 por DHAPAT, seguida del intercambio del grupo acilo por un alcohol graso, catalizado por ADHAPS, que resulta en la formación de un enlace éter. Esta última enzima puede reaccionar con una gran variedad de alcoholes grasos, tanto saturados (desde C10:0 a C18:0) como mono (C18:1) y poliinsaturados (C18:2 y C18:3). Aunque la mayoría de los alcoholes grasos requeridos por la ADHAPS proceden de la dieta, parte de ellos son sintetizados a partir de la reducción de acil-CoAs (Rizzo *et al.*, 1987; Wang *et al.*, 1995) y otra parte provienen de peroxisomas (Hayashi *et al.*, 1997). La última contribución de los peroxisomas a la biosíntesis de éter-fosfolípidos es la reducción de la alquil-DHAP por una alquil-DHAP sintasa para generar alquil-glicerol 3-fosfato (alquil-G3P). Esta enzima se localiza tanto en la membrana de los peroxisomas como en el RE (James *et al.*, 1997), de modo que los peroxisomas establecen contactos con el RE que permiten la transferencia de fosfolípidos entre ambos orgánulos (Raychaudhuri y Prinz, 2008; Lagace y Ridgway, 2013). Las siguientes modificaciones de

alquil-glicerol-3-fosfato para dar lugar a éter-fosfolípidos tienen lugar en el RE (Wanders y Waterham, 2006) (Fig. 10).

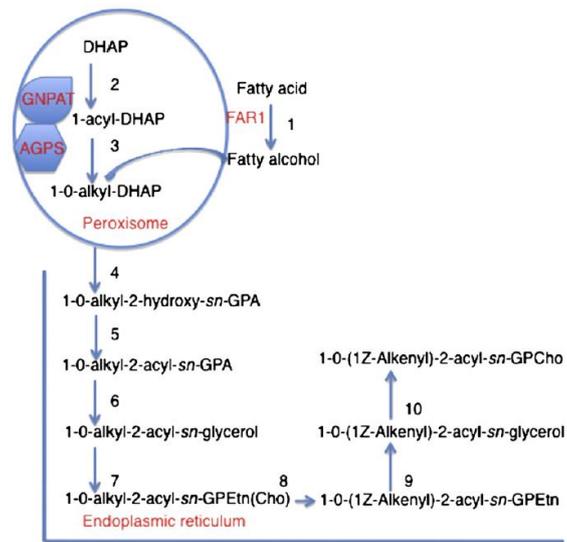


Figura 10. Ruta metabólica de síntesis de plasmalógenos. Cascada de reacciones para la biosíntesis de plasmalógenos en peroxisomas y RE. Tomado de Braverman, 2012

Los éter-fosfolípidos contienen habitualmente colina o etanolamina como grupos polares y pueden ser de dos tipos: plasmanil-fosfolípidos o plasmenil-fosfolípidos, diferenciados por la presencia de un doble enlace. Así, los primeros tienen un enlace éter 1-O-alquil y en el caso de los plasmenil-fosfolípidos es un 1-O-alque-11-enil (Wanders y Waterham, 2006). Estos últimos, caracterizados como glicerofosfolípidos con un enlace éter vinílico en la posición sn-1, se conocen como plasmalógenos y son los éter-fosfolípidos más abundantes. Normalmente contienen en la posición sn-1 un alcohol de cadena larga compuesto por C16:0, C18:0 o C18:1, mientras que en la posición sn-2 contienen un ácido graso poliinsaturado (normalmente ácido docosahexanoico o ácido araquidónico) (Wanders y Waterham, 2006). En humanos, los plasmalógenos constituyen el 18% del total de la masa de fosfolípidos y muestran una distribución específica de células y tejidos. Se han observado altos niveles de plasmeniletanolamina en cerebro, corazón, pulmón, riñón, bazo, músculo esquelético y testículos, mientras que la plasmenilcolina abunda en corazón y músculo esquelético, presentando niveles muy bajos en los otros tejidos. Son importantes constituyentes de las membranas celulares incluyendo el núcleo, el RE, la red post-Golgi y las mitocondrias; sin embargo, no se han detectado en las membranas de peroxisomas (Honsho *et al.*, 2008). Los plasmalógenos están implicados en varios procesos biológicos que afectan a la fluidez de las membranas, la transducción de señales y la protección frente al estrés oxidativo (Wanders y

Waterham, 2006; Nagan y Zoeller, 2001; Lee, 1998) y participan en el mantenimiento de la integridad de las membranas además de regular la formación de vesículas y la fusión de membranas (Schrader y Yoon, 2007; Zehmer *et al.*, 2009), el transporte de iones, y generar señalizadores, como el factor activador de plaquetas (PAF) (Wanders y Waterham, 2006; Braverman y Moser, 2012). De hecho, se ha propuesto a los plasmalógenos como antioxidantes contra las ROS gracias a la presencia del grupo éter vinílico en su estructura, lo que podría proteger a las células del estrés oxidativo (Zoeller *et al.*, 1999). No obstante, en condiciones de estrés oxidativo, algunos plasmalógenos sirven como precursores de mediadores lipídicos derivados del ácido araquidónico, como leucotrienos y ácidos hidroxí-eicosatetranoicos (Khaselev y Murphy, 1999) que actúan como importantes mediadores de la respuesta inflamatoria (Goetzl *et al.*, 1982). De hecho, un estudio lipidómico reciente en gemelos homocigóticos únicamente diferenciados por su índice de masa corporal (BMI) ha mostrado un incremento en los plasmalógenos que contienen ácido araquidónico en las membranas de los adipocitos procedentes de individuos con sobrepeso en comparación con sus gemelos delgados (Pietiläinen *et al.*, 2011). Se ha propuesto que estos cambios podrían hacer más propensos a los adipocitos a respuestas inflamatorias frente al estrés oxidativo, contribuyendo así al estado inflamatorio característico del tejido adiposo que se desarrolla en condiciones de obesidad (Rodemer *et al.*, 2003; Pietiläinen *et al.*, 2011).

Finalmente, se ha descrito la participación de los peroxisomas en la oxidación de ciertos aminoácidos y poliaminas (Wanders y Waterham, 2006; Wanders *et al.*, 2010a).

En cuanto a la participación de los peroxisomas en el metabolismo del colesterol y los isoprenoides, aunque algunos estudios iniciales lo proponían, actualmente se cuestiona su implicación en dichos procesos (Wanders y Waterham, 2006).

1.5.5. Endosomas

La interacción entre las LDs y los endosomas se planteó por primera vez al encontrar proteínas implicadas en la regulación del tráfico de membranas endosomal en los proteomas de las LDs (revisado en Hodges y Wu, 2010). Posteriormente, estudios de microscopía electrónica permitieron localizar a las proteínas endosomales Rab5 y Rab11 en la superficie de LDs aisladas, lo que llevó a sugerir que estas Rab GTPasas podrían regular la interacción entre LDs y endosomas (Liu *et al.*, 2007). De

hecho, estudios realizados *in vitro* sobre extractos purificados de LDs y endosomas demostraron que las LDs son capaces de reclutar al efector de Rab5, EEA1, y que la eliminación de las proteínas Rab de las LDs con RabGDI impide la asociación de las LDs y los endosomas (Liu *et al.*, 2007). Estos resultados proporcionan evidencias directas de la implicación de Rab5 y otros miembros de la familia Rab en la regulación de las interacciones entre LDs y endosomas. A pesar de la presencia de proteínas SNARE tanto en la superficie de las LDs como en los endosomas, se ha demostrado que el ATP causa la disociación de la unión entre ambos orgánulos, lo que indica que estos orgánulos tendrían la capacidad de unirse pero no de fusionarse (Liu *et al.*, 2007). Se ha propuesto que en los macrófagos, la interacción entre ambos orgánulos podría ser importante para dirigir las LDs a los lisosomas para la generación de colesterol mediante autofagia (Ouimet *et al.*, 2011). Además, el tráfico de la proteína caveolina-1 hasta la superficie de las LDs así como el transporte de colesterol y proteínas de unión a ácidos grasos que normalmente residen en caveolas ocurre aparentemente a través de endosomas (Goodman, 2008).

1.5.6. Ribosomas

El descubrimiento de constituyentes ribosómicos en proteomas de las LDs (Beller *et al.*, 2006; Cermelli *et al.*, 2006; Wan *et al.*, 2007) plantea la posibilidad de una asociación directa y funcional entre los ribosomas y las LDs. Estas observaciones han sido respaldadas mediante estudios de microscopía electrónica y técnicas de hibridación que han demostrado que la presencia tanto de ribosomas como de moléculas de ARN en contacto con las LDs en mastocitos (Dvorak *et al.*, 2003) y leucocitos (Wan *et al.*, 2007). Además, en células infectadas con el virus de la Hepatitis C, se ha detectado el ARN del virus en sitios específicos del RE, con frecuencia en yuxtaposición con las LDs (Targett-Adams *et al.*, 2008). En conjunto, estas observaciones han llevado a sugerir que al menos algunos de los componentes de la cubierta proteica de las LDs alcanzan éstas por traducción localizada.

1.6. Patología del tejido adiposo: obesidad e inflamación

Está claramente establecido que el aumento de tejido adiposo que ocurre en la obesidad está comúnmente asociado con la resistencia a insulina, lo que constituye un factor de riesgo principal en el desarrollo de diabetes tipo II, hipertensión, dislipemia y enfermedad cardiovascular, incluidas en el síndrome metabólico, así como a ciertos tipos de cáncer (Qureshi y Abrams, 2007; Pischon *et al.*, 2011; Bruce y Hanson, 2010).

Durante la ganancia de peso, los depósitos grasos incrementan su volumen debido tanto a un aumento del número de adipocitos como consecuencia del reclutamiento de nuevos adipocitos a partir de la diferenciación de sus células precursoras (células madre mesenquimales pluripotentes) (hiperplasia) como a un incremento del tamaño de los adipocitos (hipertrofia) (revisado en Rosen y Spiegelman, 2014). Aunque en principio se propuso que en humanos la sobrealimentación a largo plazo causaba exclusivamente incrementos en el tamaño celular sin afectar al número de adipocitos (Salans *et al.*, 1971), actualmente se acepta que la hiperplasia se mantiene durante la etapa adulta, tanto en individuos delgados como obesos (Spalding *et al.*, 2008).

La acumulación de VAT está fuertemente asociada al desarrollo de resistencia a insulina y enfermedad cardiovascular (Hamdy *et al.*, 2006; Snidjer *et al.*, 2003), mientras que se ha sugerido que el SAT podría ser incluso protector desde el punto de vista metabólico (Virtue y Vidal-Puig, 2010). Esto se ha relacionado, entre otros factores, con la mayor infiltración de macrófagos y linfocitos que sufre VAT con respecto a SAT en obesidad (O'Rourke *et al.*, 2009; Harman-Boehm *et al.*, 2007). De hecho, actualmente se considera que la obesidad conlleva el desarrollo de un estado crónico de inflamación de bajo grado que, junto a la alteración del patrón de adipocinas liberadas por dicho tejido en estas condiciones, conducirían al desarrollo de resistencia a insulina (Virtue y Vidal-Puig, 2010). En este sentido, los trabajos iniciales del grupo de Hotamisligil y Spiegelman demostrando la presencia de ARNm y proteína del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) en grasa epididimal de ratones obesos y la capacidad de estos animales para recuperar la sensibilidad a insulina tras la neutralización de esta citoquina, establecieron las bases de la hipótesis de la inflamación como causa fundamental de la resistencia a insulina asociada a obesidad (Hotamisligil *et al.*, 1993).

En la actualidad se acepta que el estado inflamatorio asociado a obesidad se relaciona con la puesta en marcha de varios procesos que conducen a estrés celular en los adipocitos (revisado en Maury y Brichard, 2010; Gregor y Hotamisligil, 2007; Virtue y Vidal-Puig, 2010; Guilherme *et al.*, 2008; Malagón *et al.*, 2013). En particular, la acumulación de lípidos en los adipocitos altera la función de varios orgánulos subcelulares, como el RE y las mitocondrias, causando estrés del RE y un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), respectivamente, que, junto con la hipoxia y el estrés mecánico provocado por la hipertrofia de estas células, inducen la activación de cascadas inflamatorias, incluyendo las rutas de señalización de las quinasas c-Jun N-terminal (JNK) e I κ B (IKK)/NF κ B. Esto, a su vez, incrementa la expresión y la secreción por parte de los adipocitos de citoquinas y quimioquinas

(TNF α ; IL-6 y MCP-1) que inducen la expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1) por las células endoteliales, lo que favorece la infiltración del tejido adiposo por macrófagos. La obesidad también induce cambios en el fenotipo de los macrófagos del tejido adiposo, que pasan de un fenotipo M2 anti-inflamatorio caracterizado por la producción de citoquinas como IL-10, a un fenotipo M1 secretor de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6 o TNF α . Además, se ha demostrado que la infiltración de linfocitos en el tejido adiposo precede y promueve la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo en obesidad (Nishimura *et al.*, 2009). Los macrófagos activados liberan entonces citoquinas pro-inflamatorias que amplifican el efecto iniciado por los adipocitos. La suma de todos estos factores interfiere con la señalización a insulina en adipocitos y causa resistencia a esta hormona. El estado inflamatorio ligado a obesidad también se ha relacionado con la interrupción de la adipogénesis (Sethi y Vidal-Puig, 2007). Los ácidos grasos liberados por los adipocitos como resultado de la necrosis/apoptosis de adipocitos y/o incremento en la lipólisis como causa de la resistencia a insulina de los adipocitos, agravan la respuesta inflamatoria y se acumulan en localizaciones ectópicas, como músculo o hígado, donde inducen resistencia a insulina mediante un mecanismo lipotóxico (Maury y Brichard, 2010, Gregor y Hotamisligil, 2007; Virtue y Vidal-Puig, 2010; Guilherme *et al.*, 2008). También se ha sugerido que las citoquinas proinflamatorias liberadas por el tejido adiposo contribuyen al desarrollo de la inflamación y la apoptosis en estos órganos y en páncreas causando diabetes de tipo II. Junto a estas moléculas señalizadoras, los individuos obesos muestran niveles elevados de adipoquinas que se han asociado a resistencia a insulina, como resistina, leptina, visfatina, lipocalina-2, RBP4, y A-FABP y una disminución en la producción de adipoquinas con propiedades insulino-sensibilizantes, como adiponectina y omentina (Ouchi *et al.*, 2011; Malagón *et al.*, 2013). Esta alteración en el patrón secretor del tejido adiposo en obesidad se ha asociado con la alteración en los lípidos circulantes, la presión sanguínea, coagulación, fibrinólisis e inflamación que conducen a la disfunción endotelial, aterosclerosis y enfermedad cardiovascular (revisado en Malagón *et al.*, 2013).

Otro de los rasgos característicos de la inflamación del tejido adiposo es la acumulación de fibrosis intersticial (Henegar *et al.*, 2008), desencadenada en las condiciones de hipoxia generada como consecuencia de la hipertrofia de los adipocitos (Sun *et al.*, 2011), que disminuye la flexibilidad de la matriz extracelular y la plasticidad del tejido. Este fenómeno se define como una acumulación excesiva de componentes de la matriz extracelular, que resulta en un desequilibrio entre la síntesis de componentes fibrilares, como colágeno I, III y VI y una deficiencia en la degradación de

estas proteínas. Esta acumulación de matriz extracelular contribuye a incrementar el ambiente desfavorable generado como consecuencia de la inflamación. En la Fig. 11 se muestra un esquema de las modificaciones que suceden en el tejido adiposo tras el establecimiento del estado proinflamatorio en obesidad.

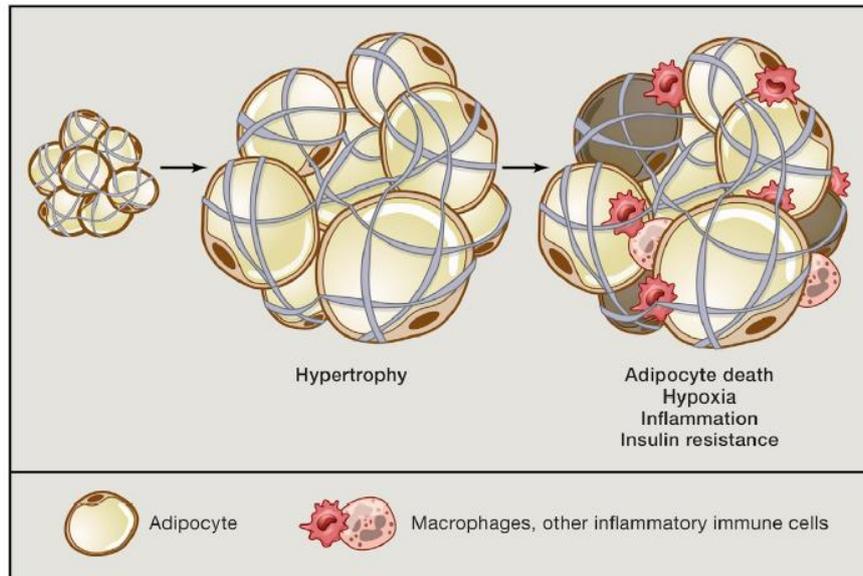


Figura 11. Inflamación del tejido adiposo en obesidad. En el esquema se representan la hipertrofia de los adipocitos y los cambios en la fracción de estroma vascular tras la activación de un estado proinflamatorio. Tomado de Rosen, 2014

OBJETIVOS

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral ha sido la caracterización de la participación de Rab18 en la regulación de la homeostasis de las gotas lipídicas y la identificación de los factores que median este proceso. Para conseguir este objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar la contribución de Rab18 en la regulación de las gotas lipídicas en adipocitos y su función como mediador de la interacción de éstas con otros orgánulos celulares que mantienen la homeostasis lipídica en estas células.
2. Analizar los mecanismos moleculares regulados por Rab18 responsables de la dinámica intracelular de las gotas lipídicas, así como la implicación de la red de citoesqueleto en este proceso.
3. Identificar las proteínas que interaccionan con Rab18 y su participación en la regulación de la actividad de la GTPasa y/o en el control de la gestión de lípidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material biológico

3.1.1. Cultivo de líneas celulares

Se ha utilizado la línea celular 3T3-L1 de células de tipo fibroblástico que provienen de embriones de ratón. Esta línea se obtuvo de la ATCC (American Type Culture Collection; LGC Standards S.L.U., Barcelona) y fue cultivada siguiendo las indicaciones del comerciante, considerando que las células no alcanzaran un grado de confluencia superior al 70-80%, ya que, la confluencia reduce su capacidad de diferenciación a adipocitos. Los cultivos celulares se mantuvieron en un incubador a 37⁰C, manteniendo un 5% de CO₂. Todos los experimentos se llevaron a cabo usando células de los pases 4 a 15. A partir del 15^o pase los cultivos se desecharon para ser sustituidos por células nuevas mantenidas en N₂ líquido.

Las células 3T3-L1 fueron cultivadas en medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* [DMEM, Lonza (Vervies, Bélgica)] con 4,5 g/l de glucosa, suplementado con L-glutamina 4 mM, antibiótico-antimicótico al 1% (v/v), 1,5 g/l de bicarbonato sódico y suero de neonato bovino (NCS) al 10% (v/v) [Gibco (Barcelona)]. Los cultivos de mantenimiento se realizaron en botellas de 75 ó 150 cm² a una densidad de 2.000 células/cm², refrescándose 2 veces a la semana mediante el uso de una solución comercial de 0,5 g/l de tripsina y 0,2 g/l de EDTA (Sigma-Aldrich, Química S.A., Madrid). Las células obtenidas se sometieron a un test de viabilidad celular con azul tripán y posteriormente se sembraron en el soporte adecuado según la finalidad del experimento. De esta forma, las células dirigidas a estudios microscópicos fueron sembradas sobre cubreobjetos de 25 mm de diámetro, que fueron colocados sobre placas individuales de 35 mm de diámetro o placas de 6 pocillos. Las células utilizadas para la obtención de extractos proteicos o de ARN se sembraron en placas individuales de 35 mm de diámetro o placas de 6 pocillos y en el caso de las células destinadas a experimentos de electroporación, la siembra se realizó sobre placas de 150 mm de diámetro. En todos los casos se mantuvo la misma densidad de siembra (3.000 células/cm²). Para su diferenciación, las células se dejaron crecer hasta alcanzar un 100% de confluencia y, en ese momento, se incubaron en DMEM con 4,5 g/l de glucosa suplementado con L-glutamina (4 mM), solución antibiótica-antimicótica al 1% (v/v), bicarbonato (1,5 g/l), suero fetal bovino al 10% (v/v) (PAA, Pasching, Austria), 10 µg/ml de insulina, 0,25 µM de dexametasona y 0,5 mM de IBMX (Medio de diferenciación I) durante 72 h. Transcurrido este tiempo, las células se incubaron en DMEM con glucosa (4,5 g/l) suplementado con L-glutamina (4 mM), solución antibiótica-antimicótica al 1% (v/v), bicarbonato sódico (1,5 g/l), suero fetal bovino

(10% v/v) e insulina (10 µg/ml) (Medio de diferenciación II), durante 72 h. A partir de ese momento, los cultivos celulares se mantuvieron en DMEM con 4,5 g/l de glucosa suplementado con L-glutamina (4 mM), solución antibiótica-antimicótica (1% v/v), bicarbonato sódico (1,5 g/l), suero fetal bovino (10% v/v) (Medio de diferenciación III). El medio se renovó cada 48 h, hasta que las células fueron utilizadas para las distintas manipulaciones experimentales (día 6 para los experimentos de transfección; días 8-10 para el resto de los estudios).

La línea celular HEK293T procedente de riñón embrionario humano utilizada para los experimentos de inmunoprecipitación fue amablemente proporcionada por el Dr. Marco Antonio Calzado (Universidad de Córdoba, España). Los cultivos celulares se mantuvieron en un incubador a 37 °C manteniendo un 5% de CO₂. Estas células fueron utilizadas entre los pases 2 y 20. A partir del 20^º pase, los cultivos se desecharon para ser sustituidos por células nuevas mantenidas en nitrógeno líquido. La línea fue cultivada en medio DMEM conteniendo glucosa 1 g/l y suplementado con L-glutamina 2 mM, solución antibiótica-antimicótica al 1% (v/v) y suero fetal bovino al 10% (v/v). Los cultivos de mantenimiento se realizaron en botellas de cultivo de 75 cm² (TPP, Trasadingen, Suiza) y se levantaron dos veces por semana utilizando una solución comercial conteniendo tripsina 0,5 g/l y EDTA 0,2 g/l (Sigma). Las células así obtenidas se sembraron en placas de 6 cm de diámetro (TPP) a una densidad de 6.000 células /cm².

3.2. Tratamientos experimentales

3.2.1. Estudio de la localización intracelular de Rab18

El efecto de isoproterenol, insulina, TNFα y la privación de suero, así como el efecto de las drogas brefeldina A (BFA), latrunculina B y nocodazol sobre la distribución intracelular de Rab18 fue analizado mediante inmunocitoquímica en células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos. La BFA se utilizó como agente inhibidor del tráfico de proteínas entre RE y Golgi (Fujiwara *et al.*, 1988), mientras que se emplearon las drogas latrunculina B y nocodazol para la desestabilización del citoesqueleto de actina y de microtúbulos, respectivamente (Eyster *et al.*, 2005; Molero *et al.*, 2001). Para llevar a cabo estos experimentos, las células fueron tratadas durante 2 h con insulina 100 nM o con isoproterenol 10 µM o mantenidas en medio carente de suero durante 24 h. Previamente a los tratamientos, las células se mantuvieron en medio DMEM con 4,5 g/l de glucosa suplementado con L-glutamina 4mM, antibiótico-antimicótico al 1% (v/v) y 1,5 g/l de bicarbonato sódico durante 2 h (pretratamiento). En el caso de los

tratamientos con las drogas, éstas fueron añadidas a los cultivos celulares durante 30 min en el caso de BFA (5 $\mu\text{g/ml}$) (Sigma) y latrunculina B (10 μM) (Calbiochem, Darmstadt, Alemania) o durante 1 h para tratamientos con nocodazol 10 μM (Sigma). A continuación, las células fueron incubadas con insulina o isoproterenol en ausencia o en presencia de la droga correspondiente durante 2 h. Para los experimentos con TNF α (20 ng/ml) (Peprtech, Rocky Hill, New Jersey, EE.UU), las células se mantuvieron durante 8 y 24 h en presencia de esta citoquina. En todos los experimentos se emplearon cultivos adicionales de células en medio DMEM con 4,5 g/l de glucosa suplementado con L-glutamina 4mM, antibiótico-antimicótico al 1% (v/v) y 1,5 g/l de bicarbonato sódico durante 2 h (control), que se mantuvieron bajo las mismas condiciones experimentales que los cultivos expuestos a los tratamientos descritos. Al final de los tratamientos, las células se procesaron para los estudios correspondientes de inmunofluorescencia, fraccionamiento subcelular y/o *Western Blotting*.

3.3. Estudios bioquímicos mediante *Western Blotting*

3.3.1. Obtención de extractos proteicos

Al final de los tratamientos, los cultivos celulares se lavaron dos veces con PBS 0,01 M, pH 7,4, y se trataron con tampón de extracción RIPA [Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tritón X-100 1% (v/v), deoxicolato sódico 1% (m/v), SDS 0,1% (m/v), pH 7,4] suplementado con inhibidores de proteasas (PMSF 0,1 mM, quimostatina 5 $\mu\text{g/ml}$, leupeptina 5 $\mu\text{g/ml}$, antipaina 5 $\mu\text{g/ml}$, pepstatina A 5 $\mu\text{g/ml}$). Las células se despegaron en un volumen adecuado de tampón de extracción (entre 100 y 400 μl). A continuación, los extractos se homogeneizaron con ayuda de una jeringa de 1 ml y aguja de 25 G. Los homogenados fueron incubados durante 30 min en hielo y se sometieron a 3 pulsos de sonicación. Posteriormente, se centrifugaron durante 5 min a 9.000 x g a 4 $^{\circ}\text{C}$ para eliminar restos celulares y los sobrenadantes se conservaron a -80 $^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis. Todos los lavados, homogeneización e incubaciones se realizaron en hielo. Para los estudios funcionales de respuesta intracelular, los extractos proteicos se obtuvieron utilizando 300 μl de tampón de extracción SDS-DTT [Tris-HCl 62,5 mM, DTT 100 mM, SDS 2% (m/v), glicerol 20% (v/v), pH 7,6] calentado a 65 $^{\circ}\text{C}$. Los extractos se sometieron a 3 pulsos de sonicación, se hirvieron durante 5 min a 97 $^{\circ}\text{C}$ y se guardaron a -80 $^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis.

3.3.2. Aislamiento de fracciones citosólica y de membrana de los adipocitos

Para el aislamiento de las fracciones citosólicas y de membrana de adipocitos 3T3-L1, se lavaron las células con tampón de homogeneización HES (HEPES 20mM, sacarosa 255 mM y EDTA 1 mM, pH 7,4). A continuación, las células se recogieron en un volumen final de 1 ml de tampón de homogeneización con inhibidores de proteasas [CLAP (1 μ /ml solución 0,1%)] y PMSF (1 μ /ml solución 0,1%)] y se homogeneizaron con un homogeneizador vidrio-vidrio durante 30 s. Posteriormente el lisado se pasó 20 veces a través de una aguja 25 G y se centrifugó a 1.000 x *g* durante 10 min a 4 °C para eliminar los núcleos y las células no lisadas. Se guardó una alícuota del sobrenadante resultante (*postnuclear supernatant*, PNS) para su posterior análisis. El resto de sobrenadante se centrifugó a 200.000 x *g* durante 2 h a 4 °C. Con esta centrifugación se obtuvo la fracción cruda de membrana (pella) y la fracción citosólica (sobrenadante). La fracción cruda de membrana se resuspendió en 1 ml de tampón RIPA [Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tritón X-100 1% (v/v), deoxicolato sódico 1% (m/v), SDS 0,1% (m/v), pH 7,4] suplementado con inhibidores de proteasas (PMSF 0,1 mM, quimostatina 5 μ g/ml, leupeptina 5 μ g/ml, antipaina 5 μ g/ml, pepstatina A 5 μ g/ml) mediante pipeteo, pasando el extracto 5 veces a través de una aguja 25 G y sonicando. A continuación se añadió la cantidad de volumen necesaria para igualar el volumen de la fracción citosólica. Las fracciones obtenidas se precipitaron con acetona.

3.3.3. Aislamiento de LDs

Para el aislamiento de fracciones enriquecidas en LDs, se lavaron las células con D-PBS, se levantaron y se centrifugaron a 70 x *g*. El pellet obtenido se resuspendió en 3 ml de tampón de lisis (Tris-HCl 25 mM pH 7,4, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, EGTA 5 mM, pH 7,4 e inhibidores de proteasas), se pasó 30 veces por una aguja 25 G en hielo y se mezcló con un volumen igual (3 ml) de tampón de lisis que contenía 1,08 M de sacarosa. Las células se centrifugaron a 1.500 x *g* durante 10 min a 4 °C. El pellet obtenido incluye la fracción de núcleos. El sobrenadante se transfirió a un tubo de ultracentrifugación de 12 ml y se añadieron secuencialmente 2 ml de tampón de sacarosa 0,27 M, 2 ml de tampón de sacarosa 0,135 M y 2 ml de *Top Solution* (Tris-HCl 25 mM, EDTA 1 mM y EGTA 1 mM, pH 7,4). La mezcla se centrifugó a 150.500 x *g* durante 2 h a 4 °C. Se recogieron 8 fracciones correspondientes a las LDs (fracciones 1 y 2), zona intermedia entre LDs y citosol (fracciones 3 y 4), y el citosol (fracciones 5-7).

La fracción 8 y la pella constituyen la fracción total de membrana. Esta fracción de membrana así como la fracción de núcleos se solubilizaron en 1,5 ml de tampón *Top Solution* mediante sonicación. Para eliminar los lípidos de la fracción de gotas lipídicas se siguió el protocolo de precipitación con acetona, mientras que el resto de fracciones se precipitaron utilizando Cloroformo/Metanol.

3.3.4. Proteómica de LDs

Para la identificación de las proteínas que forman parte de la cubierta en las LDs, se aislaron LDs de adipocitos 3T3-L1 en condiciones basales y tratados durante 4 h con insulina 100 nM. Las fracciones 1 y 2 de cada una de las condiciones obtenidas tras el aislamiento de LDs se unieron y se precipitaron mediante acetona. Las pellas resultantes se resuspendieron en 60 µl de tampón (20 mM HEPES, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 1 mM EDTA; pH 7,4) y se cuantificaron. De cada uno de los extractos, 20 µg de proteína fueron tripsinizados y procesados para cromatografía líquida de alta eficacia HPLC (Ultimate Plus, LCPackings-LTQ Finnigan, Thermo) y espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF (4700 Proteomics Analyzer, Applied Biosystems). Las huellas peptídicas obtenidas se analizaron utilizando la base de datos MASCOT (*Mascot software v2.2*; Matrix Science, London, Reino Unido).

3.3.5. Precipitación de proteínas mediante acetona

Para esta precipitación se añadieron 4 volúmenes de acetona fría por cada volumen de proteína, se mezcló y se dejó a -20 °C durante toda la noche. Al día siguiente, se centrifugó la mezcla a 1.400 x g durante 10 min a 4 °C y se eliminó el sobrenadante con cuidado para no perder el pellet. Se añadieron 100 µl de metanol frío para eliminar la acetona y se centrifugó de nuevo a 1.400 x g durante 10 min a 4 °C. Posteriormente se eliminó el metanol y se dejó secar el pellet para luego resuspenderlo en el tampón adecuado.

3.3.6. Precipitación de proteínas mediante el método Cloroformo/Metanol

La precipitación de proteínas mediante el método cloroformo/metanol, utilizada en diferentes experimentos, permite la eliminación de restos de sales y detergentes de la muestra. Para ello, y por cada 100 µl de muestra, se añadieron por orden sucesivo 400 µl de metanol, 100 µl de cloroformo y 300 µl de agua, mezclando

siempre mediante vortex tras cada paso. La mezcla se centrifugó durante 1 min a 14.000 x *g* y se eliminó la capa acuosa superior. Posteriormente, se añadió de nuevo 400 µl de metanol y se centrifugó 2 min a 14.000 x *g*. Finalmente, se eliminaron los restos de metanol y se dejó secar la pella a temperatura ambiente. La pella se resuspendió en 40 µl de tampón de carga 1,5x para su posterior análisis por *Western Blotting*.

3.3.7. Electroforesis desnaturalizante y electrotransferencia

Una vez obtenidos los diferentes extractos y fracciones proteicas, se determinó la concentración de proteína total utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976). Para ello, se mezclaron 50 µl de NaOH 50 mM con 2 µl de muestra y 1 ml de reactivo de Bradford. Tras incubar 10 min en oscuridad y a temperatura ambiente, se determinó el valor de densidad óptica (DO) a 590 nm mediante espectrofotometría. La proteína total del extracto se determinó en relación a una recta patrón. Posteriormente, las muestras se prepararon para su separación electroforética mezclando 4 volúmenes del extracto proteico con un volumen de tampón de carga 5X [Tris-HCl 500 mM, SDS 7,5% (m/v), EDTA 10 mM, sacarosa 50% (m/v), β-mercaptoetanol 5% (v/v), DTT 250 mM, azul de bromofenol 5 mg/ml, pH 6,8], se hirvieron durante 5 min para desnaturalizar las proteínas de la muestra y finalmente se centrifugaron a 8.000 x *g* durante 5 min a 4 °C para eliminar los restos insolubles. Una vez preparado el extracto proteico, unos 50 µg de proteína se sometieron a electroforesis desnaturalizante en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) utilizando el sistema de electroforesis Mini-PROTEAN Tetra (Bio-Rad, Madrid). Según el peso molecular de la proteína a estudiar, la electroforesis se realizó en geles con un porcentaje de poliacrilamida del 7,5, 10 ó 12,5%. La migración se llevó a cabo en un voltaje inicial de 80 V hasta que las muestras pasaran el gel *stacking* (poliacrilamida al 4%) seguido de un voltaje constante de 120 V hasta que el frente de migración llegara al final del gel. Una vez finalizada la electroforesis las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BioTrace NT, Pall Corp., Pensacola, FL, EE.UU.). La transferencia transcurrió a un voltaje constante de 60 V durante 75 min y con recirculación continua del tampón de transferencia [Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS al 0,2% (m/v), metanol al 20% (v/v)]. Terminada la transferencia, se dejó secar la membrana a temperatura ambiente durante 1 h (en el caso de Rab18), lo que mejora la fijación de proteínas de pequeño tamaño a la membrana, que a continuación se tiñó con Rojo Ponceau [Ponceau S al 0,1% (m/v) en ácido acético al 1% (v/v)] durante 5 min para comprobar que la transferencia había sido correcta.

3.3.8. Inmunodetección y análisis densitométrico

Las membranas fueron desteñidas y bloqueadas durante 1 h con tampón de bloqueo [TBS (Tris-HCl 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5), Tween-20 al 0,05% (v/v) (TTBS) y leche desnatada en polvo (Biorad) al 5% (m/v)]. Después, se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente diluido en tampón de bloqueo durante toda la noche a 4 °C. Las características de los diferentes anticuerpos primarios utilizados se resumen en la Tabla 1. A continuación, las membranas se lavaron tres veces durante 15 min con tampón de lavado [TBS conteniendo Tween-20 al 0,05% (v/v)] y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (Sigma) diluido en tampón de bloqueo. Finalmente, las membranas se lavaron tres veces durante 15 min con tampón de lavado. El revelado de la peroxidasa se llevó a cabo con el kit de detección de la peroxidasa basado en quimioluminiscencia (ECL-Plus GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido) y películas auto-radiográficas (BioMax XAR Kodak, Sigma). Tras el revelado, las películas se escanearon y las imágenes obtenidas fueron procesadas con el programa ImageJ 1.40j (NIH, EE.UU.) para realizar el análisis cuantitativo de las bandas inmunorreactivas mediante la cuantificación de la DO media de cada una. Para normalizar la carga de proteína en las diferentes calles, se realizó la inmunotinción contra β -actina y la DO para la proteína de interés se refirió a aquella de β -actina. En aquellos casos en que no se pudo llevar a cabo una normalización con β -actina, ésta se refirió a la DO resultante de la tinción con Rojo Ponceau en cada calle.

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados en los estudios de *Western Blotting*

Nombre	Origen	Dilución	Proporcionado por
Anti-Rab18	Conejo	1/500	Sigma-Aldrich (Madrid)
Anti-Perilipina	Cobaya	1/2000	Progen (Heidelberg, Alemania)
Anti-Calnexina	Cabra	1/100	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Alemania)
Anti-PMP70	Cobaya	1/300	Dr. Wilhelm Just (Univ. de Heidelberg, Alemania)
Anti-cMyc	Ratón	1/1000	AbD Serotec (Oxford, Reino Unido)
Anti-cMyc	Conejo	1/750	Cell Signaling (Massachusetts, EE.UU.)
Anti-HA	Ratón	1/1000	Dr. J.R. Peinado (Univ. Castilla la Mancha)
Anti-GDI2	Conejo	1/100	ProteinTech (Chicago, EE.UU.)
Anti-GFP	Conejo	1/2000	Abcam (Cambridge, Reino Unido)
Anti-Akt	Conejo	1/1000	Cell Signaling
Anti-pAkt (Ser473)	Conejo	1/1000	Cell Signaling
Anti-PTEN	Ratón	1/200	Santa Cruz Biotechnology
Anti-pPTEN (Ser380/Thr382/Thr383)	Conejo	1/1000	Cell Signaling
Anti- β -actina	Ratón	1/50000	Sigma-Aldrich
Anti-GM130	Ratón	1/750	BD Biosciences (Bedford, MA)

3.4. Transfección y electroporación de cultivos celulares

3.4.1. Transfección transitoria de líneas celulares

La introducción de vectores plasmídicos de expresión en células HEK293T se realizó mediante transfección con el reactivo *Lipofectamine* 2000 (Invitrogen, Barcelona) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células fueron transfectadas 2 ó 3 días tras su siembra, cuando el cultivo alcanzó una densidad aproximada del 60%. Así, las células cultivadas para realizar estudios de inmunoprecipitación se transfectaron con 4 µg de ADN plasmídico y 7,5 µl de *Lipofectamine* 2000 por cada placa de 6 cm de diámetro. La transfección se realizó en medio OptiMEM I (Gibco) durante 6 h. Transcurrido este tiempo, se retiró el medio de transfección y se añadió medio de cultivo fresco. Tras la transfección, las células se cultivaron durante 2 ó 3 días adicionales antes de realizar los estudios correspondientes.

3.4.2. Electroporación de líneas celulares

La introducción de vectores plasmídicos de expresión en células 3T3-L1 se llevó a cabo mediante electroporación cuando las células se encontraban a día 6 de diferenciación. Se utilizó el sistema Gene Pulse Xcell (BioRad) y cubetas de 2 mm de grosor (BioRad). Cada electroporación se realizó en un volumen final de 100 µl de medio D-PBS (Dulbecco-PBS sin Mg^{+2} ni Ca^{+2} , GibcoBRL), conteniendo cada cubeta 10 µg de vector. Los parámetros de electroporación consistieron en un voltaje de 0,11 Kv y 500 µF de capacitancia. Terminada la electroporación, las células fueron resuspendidas en 1 ml de medio completo y posteriormente sembradas en las placas correspondientes. Transcurridas 24 h de la electroporación, se cambió el medio a las placas y a las 48 h las células fueron utilizadas. En caso de los cultivos destinados a experimentos de imagen celular, los cubreobjetos se trataron con Colágeno Tipo I de cola de rata (BD Biosciences, Bedford, MA, EE.UU.) a una concentración de 0,77 mg/ml. En la Tabla 2 se resumen los vectores utilizados en la electroporación de adipocitos 3T3-L1.

Tabla 2. Vectores plasmídicos de expresión utilizados.

Nombre	Proporcionado por
pCMV-cMyc	Clontech (Mountain View, CA, EE.UU.)
pCMV-cMyc-Rab18 (cMyc-Rab18)	Este estudio
DsRed	Clontech
DsRed-Rab18	Este estudio
DsRed-GDI2	Este estudio
phrGFP-N1	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EE.UU.)
phrGFP-N1-Rab18 (GFP-Rab18)	Este estudio
phrGFP-N1-Q67L [Rab18(Q67L)]	Este estudio
pRK5-HA-MAST3K	Dr. Rafael Pulido (Universidad del País Vasco)
GFP-LRBA	Dr. William Kerr (H. Lee Moffitt Cancer Center and Research Institute, Universidad de Florida, EE.UU.)
GFP-SKL	Dr. Wilhelm Just (Universidad de Heidelberg, Heidelberg, Alemania)

3.5. Estudios de microscopía confocal

La distribución intracelular de las proteínas en células 3T3-L1 diferenciadas se estudió mediante microscopía confocal. Para ello, las células se fijaron en paraformaldehído al 4% (m/v) a temperatura ambiente en tampón PBS [PBS 0,01M pH 7,4] durante 10 min. Posteriormente, se lavaron tres veces con tampón PBS y se incubaron con tampón de bloqueo [PBS conteniendo saponina al 0,3% (v/v) y BSA al 1% (m/v)] durante 1 h. A continuación, las células se incubaron con el anticuerpo primario diluido en tampón de anticuerpo [PBS conteniendo saponina al 0,3% (v/v) y BSA al 0,5% (m/v)] durante toda la noche a 4 °C. En la Tabla 3 se indican los diferentes anticuerpos primarios utilizados para los estudios de inmunocitoquímica. El exceso de anticuerpo primario no unido fue eliminado mediante tres lavados con tampón PBS y las células fueron incubadas con el anticuerpo secundario apropiado conjugado con el fluorocromo Alexa 405, 488 ó 594 (Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.) a temperatura ambiente durante 2 h. Finalmente, las células se lavaron tres veces con tampón PBS y el cubreobjetos conteniendo las células inmunoteñidas se montó sobre un portaobjetos utilizando medio de montaje de PBS: Glicerol (1:1).

En aquellos casos en que únicamente se analizó la distribución de una proteína expresada exógenamente y unida a un marcador fluorescente (GFP o DsRed), el protocolo de preparación de las muestras terminó tras la fijación. Para la identificación de mitocondrias, RE o LDs, las células fueron incubadas con los marcadores vitales *Mitotracker Red CMXRos* 250 nM, *ER-Tracker™ Red* 1 mM o *BODIPY493/503* 5 µM

(Invitrogen, Barcelona), respectivamente, durante 30 min a 37 °C de forma previa a la fijación. El marcaje de los filamentos de actina se realizó sobre células ya fijadas utilizando faloidina a una concentración de 0,15 µM durante 30 min.

Tabla 3. Anticuerpos primarios utilizados para los estudios de inmunocitoquímica.

Nombre	Origen	Dilución	Proporcionado por
Anti-Rab18	Conejo	1/500	Sigma Aldrich (Madrid)
Anti-Perilipina	Cobaya	1/1000	Progen (Heidelberg, Alemania)
Anti-Calnexina	Cabra	1/100	BD Biosciences (Bedford, MA, EE.UU.)
Anti-PMP70	Cobaya	1/300	Dr. W. Just (Univ. de Heidelberg, Alemania)
Anti-cMyc	Ratón	1/1000	AbD Serotec (Oxford, Reino Unido)
Anti-DGAT2	Cabra	1/300	Novus Biologicals (Littleton, CO, EE.UU.)
Anti-HA	Ratón	1/1000	Dr. J.R. Peinado (Univ. Castilla la Mancha)

Las preparaciones fueron examinadas mediante microscopía confocal utilizando un equipo LSM 5 Exciter (Carl Zeiss). Para la adquisición de la señal del fluorocromo Alexa 488 y la de GFP las muestras fueron excitadas a 488 nm y se adquirió la fluorescencia emitida entre 500 y 550 nm. En el caso del fluorocromo Alexa 594, la excitación se realizó a 543 nm y se recogió la emisión entre 610 y 700 nm, mientras que para el fluorocromo Alexa 405, la excitación de la muestra se realizó a 405 nm y la emisión fue recogida entre 420 y 480 nm. Dependiendo de la localización de la señal fluorescente y del tamaño celular, se adquirieron entre 10 y 20 planos confocales por cada canal. El conjunto de todos los planos para cada célula y canal fueron sometidos a un proceso de deconvolución con el software Huygens Essential 2.4.4 (SVI, Hilversum, Holanda) y se procesaron y analizaron utilizando los programas ImageJ 1.40g e Imaris 7.0.0 (Bitplane, Zurich, Switzerland). Concretamente, se realizaron ensayos análisis de localización a nivel de LDs y para ello, una vez obtenida la proyección máxima bien del conjunto de planos, o de los planos medios de la célula, se seleccionaron las LDs, analizando al menos 150 LDs por condición en el caso de población total y 30 LDs en las Rab18-LDs de al menos 10 células. En los ensayos llevados a cabo con el fin de estudiar la presencia de Rab18 en LDs, se utilizó como referencia el marcador de LDs, PLIN, mientras que en el caso de estudios de asociación con otros orgánulos de las Rab18-LDs se trabajó sobre la población de LDs que presentaban Rab18 claramente asociado a su superficie. Todas las gotas se analizaron con Imaris 7.0.0 para obtener los coeficientes de colocalización Mander. Este parámetro mide el grado de solapamiento entre dos señales y asigna un valor numérico entre 0 y 1, donde 0 indica la falta de

solapamiento de señales y 1 implica coincidencia total de las dos señales. Se consideró colocación entre dos señales cuando el índice de colocación de Mander superó un valor de 0,1 u.a.; por debajo de este valor se consideró que las señales fluorescentes no coincidían. Para la medida de la superficie de las LDs, se utilizó el programa ImageJ 1.40g tomando como referencia para la medida el diámetro del núcleo de los adipocitos, que se estimó en 10 μm .

3.6. Estudios de movimiento intracelular mediante videomicroscopía en tiempo real

Para analizar en tiempo real el efecto de la insulina y del isoproterenol en la relación espacial de peroxisomas, mitocondrias o RE con respecto a Rab18 asociado a LDs se utilizó videomicroscopía sobre células vivas 3T3-L1 co-electroporadas con los vectores de expresión de DsRed-Rab18 y GFP-SKL (para estudios de Rab18-LDs y peroxisomas), células electroporadas con GFP-Rab18 e incubadas con *Mitotracker* 250 nM (para estudios de Rab18-LDs y mitocondrias), o células electroporadas con GFP-Rab18 e incubadas con *ER-TRACKER* 1 mM (para estudios de Rab18-LDs y cisternas de RE) durante 30 min a 37 °C. Se analizó el patrón de colocación de Rab18 con el marcador correspondiente a lo largo del tiempo, incluyendo antes (condiciones basales) y después de la adición de insulina (100 nM) o isoproterenol (10 μM) al medio de cultivo. Las células se visualizaron en un microscopio invertido Nikon Eclipse TE 2000 E (Nikon, Tokio, Japón), acoplado a una cámara Hamamatsu ORCA II BT (Hamamatsu City, Japón), controlada con el programa MetaMorph (Universal Imaging Corp., West Chester, PA, EE.UU.). Se tomaron imágenes de cada canal cada 10 s, de manera que se adquirieron 16 imágenes durante 160 s antes de hacer el tratamiento y 32 imágenes tras el tratamiento durante los 320 s siguientes al tratamiento (16 imágenes en el caso de retículo). Las series de imágenes de cada experimento se procesaron con los programas Huygens Professional 4.3.1., ImageJ 1.40g e Imaris 7.0.0.

3.7. Estudios funcionales

3.7.1. Determinación de la actividad lipolítica celular en células 3T3-L1

Las células electroporadas se lavaron una vez con medio DMEM sin rojo fenol (Sigma-Aldrich) complementado con NaHCO_3 20 mM, HEPES 1mM, L-glutamina 4 mM y antibiótico-antimicótico al 1% (v/v), pH 7,4, para eliminar restos celulares y

posteriormente se incubaron durante 2 h en dicho medio (pretratamiento). A continuación, se refrescó el medio a las células y se incubaron durante 4 h. Tras este tiempo, se recogió el medio para la cuantificación de glicerol libre utilizando el método colorimétrico del kit comercial *Free Glycerol Determination Kit* (FG0100; Sigma). Este kit contiene las enzimas y sustratos necesarios para llevar a cabo las reacciones que se indican en la Fig. 12.



Figura 12. Reacciones que se llevan a cabo durante la cuantificación de glicerol libre en el medio.

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

3.7.2. Determinación de la actividad lipogénica de células 3T3-L1

Las células electroporadas se lavaron una vez con medio DMEM sin rojo fenol complementado con NaHCO_3 20 mM, HEPES 1 mM, L-glutamina 4 mM y antibiótico-antimicótico al 1% (v/v), pH 7,4, para eliminar restos celulares y posteriormente se incubaron durante 2 h en medio de pretratamiento. A continuación, se refrescó el medio a las células y se incubaron durante 4 h. Tras este tiempo, se recogieron las células en tampón RIPA para así determinar los triglicéridos intracelulares, tomándose además una pequeña alícuota de extracto celular para la determinación de proteína en cada extracto mediante el método de Bradford. Para valorar la lipogénesis, se midió la cantidad de triglicéridos intracelulares acumulados utilizando el método colorimétrico del kit comercial *Serum Triglyceride Determination kit* (TR0100; Sigma). Este kit

contiene las enzimas y sustratos necesarios para el desarrollo de las reacciones indicadas en la Fig. 13.

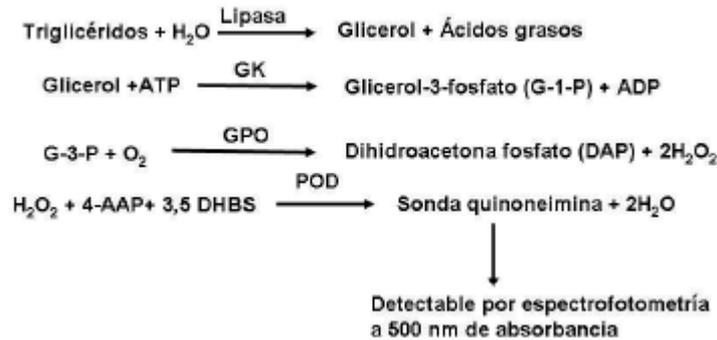


Figura 13. Reacciones que se llevan a cabo para la cuantificación de TAGs en las muestras.

En este caso, en la cubeta se cargaron 50 μl de extracto proteico de las células (ó 10 μl de *Glycerol Standard* [en dilución 1/10 y puro]) y 200 μl de *Free Glicerol Reagent*. Se mezcló todo y la mezcla se incubó durante 15 min a temperatura ambiente para posteriormente medir la absorbancia a 540 nm. A continuación, se añadieron 50 μl de *Triglyceride Reagent*, se mezcló de nuevo por inversión y se incubó la mezcla durante 15 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se midió de nuevo la DO a 540 nm.

3.7.3. Análisis del papel de Rab18 sobre la señalización mediada por insulina en adipocitos

Para analizar la respuesta intracelular activada por insulina en adipocitos 3T3-L1, se evaluaron los niveles de fosforilación de enzimas de la ruta de señalización asociada a insulina. Concretamente, en el presente estudio se analizaron los niveles de fosforilación de Akt y PTEN en células en las que la expresión de Rab18 había sido modificada por sobreexpresión. Para ello, se utilizó el vector pCMV-cMyc-Rab18 o su control, el vector vacío (*mock*). Las células electroporadas se distinguieron de otras células en el mismo cultivo por medio del uso del epítipo cMyc como reportero de la electroporación. Así, los adipocitos 3T3-L1 fueron electroporados y sembrados en placas de 35 mm de diámetro. Los cultivos fueron sometidos a 2 h de pretratamiento con medio sin suero. Posteriormente, se añadió insulina 100 nM durante periodos cortos de tiempo (0, 5, 15, 30, 60 y 120 min) y se recogieron los extractos proteicos en tampón SDS-DTT a 65 $^{\circ}\text{C}$ como se ha descrito previamente (apartado 3.3.1.). Como indicador de la respuesta celular activada por insulina, se analizaron los niveles de

fosforilación de la proteína Akt durante los tiempos de estimulación indicados. Para ello se llevó a cabo un *Western Blotting* utilizando los anticuerpos anti-fosfo-Akt (Ser473) y anti-fosfo-PTEN (Ser380/Thr382/383). Del mismo modo, a partir de los mismos extractos, se analizó la cantidad total de PTEN y Akt, respectivamente, utilizando anticuerpos anti-PTEN y anti-Akt, normalizando así la carga de proteína en las diferentes calles. Finalmente, para obtener una cinética normalizada en la respuesta de Akt, los valores de DO obtenidos se refirieron al valor de 5 min de estimulación con insulina de las células control (ya que no se observa fosforilación de Akt en ausencia del tratamiento).

3.7.4. Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Para el ensayo de ROS, los adipocitos se electroporaron con el vector pCMV-Myc-Rab18 o el vector vacío (pCMV-cMyc). Transcurridas 48 h de la electroporación las células se lavaron 2 veces con PBS y se incubaron durante 30 min a 37 °C con diclorofluoresceína diacetato (H₂DCFDA) 10 µM. Posteriormente, se lavaron de nuevo con PBS y se analizó su fluorescencia con una longitud de onda de excitación/emisión de 488/525 nm usando un fluorímetro (FlexStation3, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE.UU.). Los resultados obtenidos se representaron como ratio de la intensidad de fluorescencia de las células que sobreexpresaban Rab18 con respecto al control.

3.7.5. Determinación de la actividad catalasa

Para la determinación de la actividad catalasa en adipocitos 3T3-L1 se utilizaron los vectores pCMV-Myc-Rab18 y el vector vacío (pCMV-cMyc) para la electroporación de las células. Transcurridas 48 h, se recogieron las células en tampón KH₂PO₄ 50 mM, pH 7,0 con inhibidores de proteasas (PMSF 0,1 mM, quimostatina 5 µg/ml, leupeptina 5 µg/ml, antipaina 5 µg/ml, pepstatina A 5 µg/ml) y se incubaron 130 µg de los extractos celulares con H₂O₂ 10 mM monitorizando la disminución de la absorbancia del H₂O₂ a 240 nm. Finalmente, la actividad catalasa se representó como ratio de actividad de las células que sobreexpresaban Rab18 con respecto al control.

3.8. Ensayos de interacción proteína-proteína para la determinación de proteínas efectoras de Rab18

Las interacciones proteína-proteína son esenciales para una gran variedad de procesos biológicos como la replicación, la transcripción, la secreción, la transducción de señales y el metabolismo (revisado en Andreani y Guerois, 2014). En este contexto, se ha desarrollado una amplia variedad de aproximaciones metodológicas dirigidas a la determinación de interacciones entre dos o más proteínas, tanto *in vivo* como *in vitro*. En este trabajo se han utilizado 2 ensayos diferentes para la identificación de posibles proteínas, reguladoras o efectoras, que interactúan con Rab18: inmunoprecipitación y ensayo de doble híbrido de levadura (*Yeast Two-Hybrid*; Y2H).

3.8.1. Ensayos de inmunoprecipitación

La técnica de inmunoprecipitación, se basa en la capacidad de los anticuerpos para formar complejos antígeno-anticuerpo cuando son añadidos a lisados celulares. Para llevar a cabo estos experimentos, se electroporaron 3 placas de 15 cm de diámetro de células 3T3-L1 con el plásmido de expresión pCMV-cMyc-Rab18. Se utilizó además una placa control de células 3T3-L1 electroporadas con el vector vacío (*mock*) bajo las mismas condiciones que el vector de expresión de Rab18. Transcurridas 48 h tras la electroporación, las placas se lavaron 3 veces con PBS 1X y la pella resultante se resuspendió en 500 µl de tampón IP (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM y Triton X-100 al 1%) conteniendo PMSF e inhibidores de proteasas. Las células se lisaron pasando la muestra 20 veces a través de una aguja 25 G en hielo y la mezcla se centrifugó a 9.300 x g durante 10 min, recogiendo el sobrenadante. Se obtuvieron entre 0,75 y 1 mg de proteína, que se resuspendieron en un volumen final de 1 ml con tampón IP conteniendo PMSF e inhibidores de proteasas. La muestra se trató con ADNasa durante 30 min a 4 °C para eliminar las posibles contaminaciones de ADN. Transcurrido este tiempo, el sobrenadante se incubó durante 1 h a 4 °C con bolas (*beads*) de proteína A acoplada a sefarosa (Invitrogen), que fueron lavadas previamente 3 veces con el tampón IP sin PMSF y sin inhibidores de proteasas y centrifugadas a 100 x g durante 1 min. Tras la incubación del extracto proteico con la proteína A acoplada a sefarosa, la muestra se centrifugó durante 1 min a 4 °C para eliminar las *beads* y se guardó una alícuota de 75 µl de muestra (INPUT). Esta etapa de la inmunoprecipitación o preclarado permitió descartar todas las proteínas que pudieran establecer uniones inespecíficas con la proteína A o con la sefarosa.

La muestra se incubó con 2 µg del anticuerpo anti-cMyc (AbD Serotec) durante toda la noche a 4 °C en agitación orbital para permitir la unión del anticuerpo a la proteína cMyc-Rab18. Al día siguiente, el extracto proteico se incubó con 50 µl de *beads* de proteína A acoplada a sefarosa previamente lavadas, y la mezcla se dejó en agitación durante 2 h a 4 °C para permitir la adsorción de la proteína A al anticuerpo debido a la gran afinidad de esta proteína por el fragmento Fc de la inmunoglobulina. Ésto provoca la sedimentación de los complejos que contienen *beads* de sefarosa-proteína A/anticuerpo anti-cMyc-cMyc-Rab18 y las posibles proteínas efectoras que interaccionan con Rab18 y que estarán unidas al complejo a través de su unión a esta GTPasa. Transcurrido el tiempo de incubación, la muestra se centrifugó a 100 x g durante 1 min, se guardó el sobrenadante (SN) y las *beads* se lavaron 4 veces en tampón de IP con inhibidores de proteasas conservando el último lavado (WASH). Finalmente, la pella se resuspendió en 100 µl de tampón de carga Laemmli a una concentración 2X. La mezcla se calentó durante 10 min a 95 °C y se centrifugó a 100 x g durante 1 min para disociar las *beads* de sefarosa del complejo formado y para su posterior análisis por *Western Blotting*. Las proteínas resultado de la inmunoprecipitación fueron separadas por electroforesis y fijadas con una solución de metanol al 10% y acético al 7% (v/v) durante 30 min para ser posteriormente identificadas mediante tinción con *Sypro Ruby Protein Stains* (Bio-Rad). Los geles se mantuvieron toda la noche en oscuridad y en agitación, tras lo cual se fijaron con la solución metanol/acético durante 30 min y finalmente se lavaron 3 veces (5 min) con agua destilada. Se recogieron imágenes de los geles con un escáner (*Molecular Imager™ Fx*, Bio-Rad) y las proteínas presentes en la muestra IP y no en la muestra control se cortaron y se enviaron al Servicio Central de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Córdoba (SCAI) para su fragmentación y análisis mediante MALDI-TOF/TOF (4700 Proteomics Analyzer, Applied Biosystems, Madrid). Las huellas peptídicas obtenidas se analizaron utilizando la base de datos MASCOT (*Mascot software v2.2*; Matrix Science, London, Reino Unido).

3.8.2. Ensayo de doble híbrido en levaduras

El ensayo de doble híbrido en levadura permite la identificación de proteínas que interaccionan con una proteína determinada en un sistema *in vivo*. En este trabajo, empleamos el sistema de doble híbrido optimizado con el kit *Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System* (Clontech). Este procedimiento se basa en la capacidad de separar un activador transcripcional en dos dominios independientes, el dominio de unión al ADN (BD) y el dominio de activación transcripcional (AD). De esta forma, se

generan, por un lado, híbridos del BD de la proteína GAL4 de levadura con la proteína problema o *bait* y por otro lado también se construyen híbridos del AD de GAL4 con las proteínas de una librería. Ninguno de estos híbridos por sí solo es capaz de iniciar la transcripción de los genes reporteros en levadura en ausencia de interacción con otra proteína híbrida. Cuando la proteína *bait* se expresa en levadura, el BD de GAL4 se une a la región reguladora del gen reportero pero esta unión no es suficiente para activar la transcripción. Cuando es una proteína de la librería la que se expresa en levadura, el AD de Gal4 puede unirse a otros componentes de la maquinaria de transcripción, pero como no se localiza en la región reguladora tampoco es capaz de activar la transcripción del gen reportero. Sin embargo, cuando se da una interacción específica entre la proteína *bait* y una proteína de la librería, tanto el BD como el AD de GAL4 se localizan en la región reguladora permitiendo de esta forma la transcripción de los genes reporteros. En este sistema concreto los genes reporteros son AUR1-C, ADE2, HIS3 y MEL1 (Fig. 14). El *bait* utilizado fue la secuencia de Rab18 de rata que se utilizó sobre una librería de tejido adiposo subcutáneo de rata.

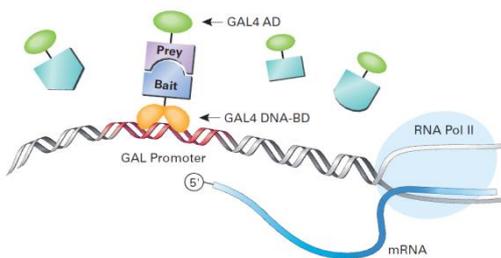


Figura 14. Sistema de doble híbrido en levaduras. Se expresan dos proteínas por separado: la proteína *cebo* (*bait*) fusionada al dominio de unión a ADN de GAL4 (BD) y la proteína *presa* (*prey*) fusionada al dominio de activación transcripcional de GAL4 (AD). En la cepa de levadura Y2H-Gold, la activación de los reporteros (AUR1-C, ADE2, HIS3 y MEL1) sólo se produce en las células que contengan proteínas que interactúan y se unen al promotor GAL4 (*Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System User Manual*, Clontech).

3.8.2.1. Clonación de la secuencia codificante del gen *Rab18* de rata en el vector de expresión de levaduras

La clonación de la secuencia codificante de Rab18 de rata se hizo a partir del vector GFP-Rab18 que fue digerido con las enzimas EcoRI y BamHI para extraer la secuencia codificante de Rab18. De esta forma, el dominio de activación GAL4 DNA-BD quedó fusionado al extremo N-terminal de Rab18.

3.8.2.2. Generación de la librería de tejido adiposo de rata

Debido a que no hay librerías de tejido adiposo disponibles a nivel comercial, se generó una utilizando el kit comercial *Make Your Own "Mate & Plate™" Library System* (Clontech). La generación de esta librería se llevó a cabo directamente en la cepa Y187

haciendo uso de la tecnología SMART cDNA y la potente maquinaria de recombinación homóloga de *Saccharomyces cerevisiae*.

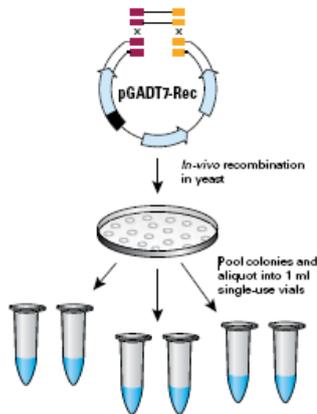


Figura 15. Procedimiento de obtención de la librería en levaduras. Las librerías *Mate & Plate* se generan directamente en levaduras, vía recombinación in vivo entre el ADNc extraído del tejido de interés y el vector pGADT7-Rec. Primero, se utiliza la tecnología SMART de síntesis de ADNc para generar un *pool* de ADNc que presenta secuencias en sus extremos homólogas al vector pGADT7-Rec. A continuación, se transforma la cepa de levaduras Y187 en la que se producirá una recombinación entre los fragmentos de ADNc y el vector. Estas colonias se mezclan y se recogen en alícuotas de 1 ml para ser utilizadas en el ensayo de doble híbrido.

Este protocolo incluye cuatro pasos (Fig. 16):

- Extracción de ARN del tejido de interés
- Síntesis de la primera cadena de ADNc
- Amplificación del ADNc por PCR de larga distancia (LD-PCR)
- Purificación en columna del ADNc de doble cadena con columnas CHROMA SPIN TE-400

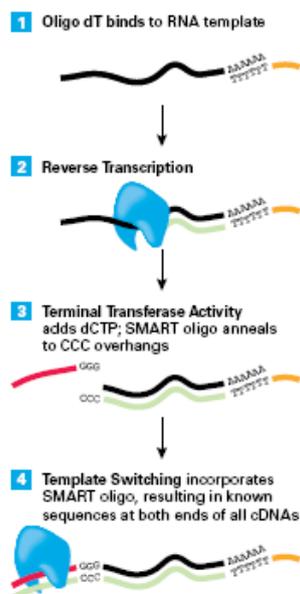


Figura 16. Construcción de la librería. La síntesis de ADNc SMART genera extremos en el ADNc con homología al vector pGADT7-Rec.

3.8.2.2.1. Extracción de ARN de tejido adiposo de rata

El aislamiento de ARNm total de las muestras de tejido adiposo subcutáneo de rata se llevó a cabo utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La concentración de ARN total obtenido se determinó por espectrofotometría y su calidad se comprobó mediante la relación entre la absorbancia a 260 y 280 nm. Una vez obtenido un ARN de buena calidad se comenzó con el protocolo específico para la construcción de la librería.

3.8.2.2.2. Síntesis de la primera cadena de ADNc

La construcción de la librería de tejido adiposo de rata se llevó a cabo con cebadores oligodT. De esta forma, se mezclaron 2 µg de ARN con 1 µl de cebadores CDSIII (oligodT) y agua destilada hasta completar un volumen de 4 µl. De forma paralela se llevó un control de ARN de hígado de ratón proporcionado por el kit que siguió el mismo proceso que la muestra de ARN de tejido adiposo. Esta mezcla se incubó a 72 °C durante 2 min y posteriormente se enfrió en hielo durante dos minutos. A continuación se centrifugó a 14.000 x g durante 10 s y se añadieron 2 µl de *5X First-Strand Buffer*, 1 µl de DTT 100 mM, 1 µl de dNTPs 10 mM y 1 µl de transcriptasa reversa *SMART MMLV* para después incubar a 42 °C durante 10 min. Transcurrido el tiempo de incubación se añadió 1 µl de oligo *SMART III*, se mezcló bien y se incubó de nuevo a 42 °C durante 1 h y, finalmente, a 75 °C durante 10 min. Una vez enfriada la mezcla a temperatura ambiente, se añadieron 2 U de RNAsa H y la mezcla se incubó a 37 °C durante 20 min.

3.8.2.2.3. Amplificación del DNAc por PCR de larga distancia (LD-PCR)

Este paso se basa en una reacción de PCR utilizando como molde el producto del paso anterior. De esta forma, se llevaron a cabo dos reacciones de PCR por cada muestra experimental (incluyendo el control previo de ARN de hígado de ratón proporcionado por el kit). La mezcla de PCR contiene:

- 2 µl de ADNc
- 70 µl de agua desionizada
- 10 µl de *Advantage 2 PCR Buffer*
- 2 µl de mezcla de dNTPs 50X
- 2 µl de cebador 5' PCR

2 μ l de cebador 3' PCR

10 μ l de *Melting Solution* 10X

2 μ l de *Advantage 2 Polimerase Mix* 50X

Se utilizó el programa de PCR indicado en las instrucciones de la casa comercial. Una vez finalizada la PCR se analizó una alícuota de 7 μ l en un gel de agarosa al 1,2%.

El patrón de bandas obtenido a partir del tejido adiposo fue mucho más débil que el del control, de forma que se amplificó de nuevo utilizando como molde el producto de esta PCR. Se analizaron 7 μ l del producto de esta segunda PCR en un gel de agarosa al 1,2%. Esta reamplificación generó mejores resultados, por lo que, a partir de esta muestra se llevó a cabo una nueva reamplificación cuyos productos fueron purificados con las columnas CHROMA SPIN TE-400.

3.8.2.2.4. Purificación en columna del ADNc

Este paso consistió en la eliminación de aquellas moléculas de ADN que tienen un tamaño menor a 200 pb. Para ello, las muestras de ADNc obtenidas en el paso anterior se pasaron por columnas CHROMA SPIN TE-400. Se utilizó una columna por cada 93 μ l de muestra de ADNc, siendo por tanto necesarias dos columnas para la librería. Para la preparación de las columnas fue necesario eliminar el tampón de equilibrado por centrifugación. Posteriormente, se añadieron los 93 μ l de muestra en el centro de la matriz de gel de las columnas. Se centrifugó a 700 x g durante 5 min de manera que la muestra purificada pasó al tubo colector. En este momento se mezclaron las dos muestras purificadas para proceder a la precipitación del ADNc. Para ello, se añadieron 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M, y 2,5 volúmenes de etanol 100% frío y la mezcla se guardó a -20 °C durante una noche para favorecer la precipitación. Al día siguiente, las muestras se centrifugaron a 16.000 x g durante 20 min a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante. Una vez que se secó la pella de ADNc, ésta se resuspendió en 20 μ l de agua desionizada. Este procedimiento permitió la obtención de 9 μ g de ADNc.

3.8.2.3. Transformación de levaduras con el ADNc de tejido adiposo

El último paso en la construcción de la librería conlleva la introducción del ADNc purificado en la cepa de levadura Y187, en la que se llevará a cabo la recombinación homóloga con el vector pGADT7-Rec *in vivo*.

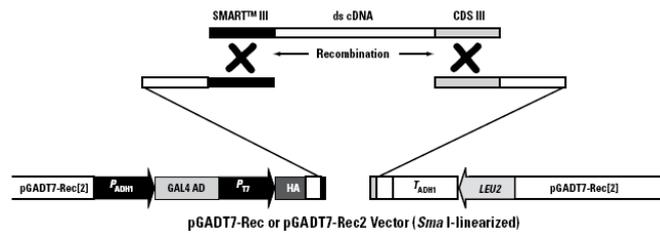


Figura 17. Mecanismo de recombinación *in vivo* por el que se generan los vectores de la librería.

Para transformar las levaduras, se siguió el protocolo recomendado por Clontech, con algunas modificaciones, como se describe a continuación: las colonias de la cepa de levadura Y2HGold y la cepa Y187, sembradas previamente en placas de YPDA, se inocularon con 50 ml de medio completo YPDA en matraces de 250 ml de capacidad y se dejaron crecer a 30 °C en agitación (250 rpm) durante 16-18 h. De este cultivo se recogieron 8 ml, que se centrifugaron durante 2 min a 2.300 x g. La pella resultante se lavó con 1,1 x TE/LiAc recién preparado para finalmente resuspenderse en 600 µl de 1,1 x TE/LiAc. Para la transformación a gran escala, en un tubo de 15 ml se mezclaron 600 µl de la suspensión de levaduras, 15 µg de ADNc obtenido de la librería de tejido adiposo, 3 µg de vector pGADT7-Rec, 20 µl de *YeastMaker carrier DNA* previamente desnaturizado y 2,5 ml de solución PEG/LiAc, con la precaución de preparar las mezclas de transformación en el orden descrito y la solución de PEG/LiAc recién preparada. La mezcla de transformación se agitó por inversión y se incubó a 30 °C durante 45 min agitando la mezcla cada 15 min. A continuación, se añadieron 160 µl de DMSO y la mezcla se sometió a un choque térmico a 42 °C en baño maría durante 20 min con agitación cada 10 min. La muestra se centrifugó durante 5 min a 700 x g descartando el sobrenadante y las levaduras se resuspendieron en 3 ml de *YPD Plus Liquid Medium* para, a continuación, incubarlas a 30 °C durante 90 min en agitación. Transcurrida esta incubación, la muestra se centrifugó, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 15 ml de NaCl al 0.9% (m/v). La mezcla de transformación se repartió en placas SD/-Leu de 15 cm de diámetro, cada una con 150 µl, que se incubaron a 28-30 °C durante 3-5 días. Tras el crecimiento de las colonias, las placas se enfriaron a 4 °C durante 3-4 h para después recoger los clones positivos en 5 ml medio de congelación (YPDA con glicerol al 25%), de forma que la librería presentó un volumen final de 0,5 l. Con un hemocitómetro se procedió al recuento de la densidad celular, siendo éste de aproximadamente 2×10^7 células/ml. La solución celular se almacenó en alícuotas de 1 ml a -80 °C.

3.8.2.4. Transformación de levaduras

Para la transformación de levaduras, se siguió el protocolo recomendado por Clontech, con algunas modificaciones, como se describe a continuación: colonias de las cepas de levadura Y2HGold o Y187 se inocularon sobre 50 ml de medio completo YPDA en matraces de 250 ml de capacidad. Se dejaron crecer toda la noche a 30 °C en agitación (250 rpm) durante 16-18 h. Posteriormente se recogieron 2 ml de la suspensión y se centrifugaron durante 2 min a 2.300 x g. La pella resultante se resuspendió en 50 µl de 1.1 x TE/LiAc fresco. Para cada transformación, se utilizaron los 50 µl de la suspensión de levaduras en tubos de 1.5 ml y 500 µg del plásmido correspondiente. En la Tabla 4 se muestran las diferentes mezclas empleadas para obtener los controles apropiados. Concretamente, como controles del emparejamiento se utilizaron los vectores pGADT7-T, pGBKT7-53 y pGBKT7-Lam para transformar las cepas de levaduras. También se utilizó un control de transformación consistente en la transformación de la cepa Y2HGold con el vector pGBKT7 vacío.

Tabla 4. Mezclas de transformación de levaduras con el vector Rab18 y todos los vectores control del ensayo.

Vector (500 µg)	<i>Herring Tester Carrier DNA denatured*</i>	<i>Cepa Y187</i>	<i>Cepa Y2HGold</i>	<i>PEG/LiAc</i>
<i>pGBKT7</i>	5 µl	-	50 µl	500 µl
<i>pGBKT7-Rab18</i>	5 µl	-	50 µl	500 µl
<i>pGADT7-T (control #1)</i>	5 µl	50 µl	-	500 µl
<i>pGBKT7-53 (control #2)</i>	5 µl	-	50 µl	500 µl
<i>pGBKT7-Lam (control #3)</i>	5 µl	-	50 µl	500 µl

* Previamente calentado dos veces a 100 °C durante 5 min antes de añadir a la mezcla de transformación.

Las mezclas de transformación se agitaron suavemente y se incubaron a 30 °C durante 30 min agitando la mezcla mediante vórtex cada 10 min. Transcurrido este tiempo, a cada mezcla de transformación se le añadieron a cada mezcla de transformación 20 µl de DMSO y se incubaron a 42 °C durante 15 min agitándose mediante vórtex cada 5 min. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 16.000 x g durante 15 s para obtener la pella de levaduras, que se resuspendió en 1 ml de YPD *Plus Liquid Medium*, para a continuación incubarlas a 30 °C durante 90 min en agitación. Finalmente, se centrifugó de nuevo y se resuspendió la pella de levaduras en

1 ml de NaCl al 0.9% (m/v). La mezcla de transformación se sembró en placas de 10 cm de diámetro (100 µl/placa), que se incubaron a 28-30 °C durante 3-5 días. Las levaduras Y2HGold transformada con los vectores pGBKT7, pGBKT7-Rab18, pGBKT7-53 y pGBKT/-Lam se sembraron en placas con medio completo sin triptófano con y sin X-α-Gal (SD/-Trp/x-α-Gal; SD/-Trp), mientras que las levaduras Y187 que llevan el vector control pGADT7 T se sembraron en placas con medio completo sin leucina (SD/-Leu).

3.8.2.5. Control de toxicidad de Rab18.

Antes de comenzar con el ensayo de hibridación es necesario hacer controles de toxicidad de la proteína de expresión. Así, se considera que la proteína *cebo* no es tóxica para la cepa Y2HGold si ésta crece en las placas SD/-Trp/X-α-Gal formando colonias azules de 2-3 mm de diámetro, y con una tasa de crecimiento igual o superior a las levaduras transformadas con el vector *mock* (pGBKT7). Otra forma de comprobar la posible toxicidad de una proteína es mediante crecimiento en medio líquido comparando la DO de cultivos de levaduras transformadas con el vector *mock* con aquéllas que presentan la proteína en cuestión. En el caso de Rab18 no se encontró una disminución en la tasa de crecimiento de las levaduras comparando con el vector *mock* en ninguno de los dos métodos analizados, indicando que su expresión no resultó tóxica para la cepa de levadura testada.

3.8.2.6. Control de autoactivación de Rab18

El siguiente paso antes de comenzar el emparejamiento de ambas cepas de levaduras es confirmar que la proteína *cebo* no es capaz de activar de forma autónoma los genes reporteros de la cepa Y2HGold. Para confirmar este punto, se transformó la cepa Y2HGold con pGBKT7-Rab18 y el resultado de la transformación se sembró en placas SD/-Trp/X α-Gal con y sin Aureobasidina A (AbA). Tras 3-5 días en cultivo, se encontró que las levaduras transformadas con Rab18 eran de color blanco en las placas SD/-Trp/X α-Gal mientras que no crecieron en las placas SD/-Trp/X α-Gal/AbA, lo que demuestra que Rab18 no es capaz de activar por sí sola los genes reporteros de Y2HGold.

3.8.2.7. Análisis de la expresión de Rab18

Se comprobó la expresión de Rab18 en las levaduras Y2HGold mediante el análisis por *Western Blotting* del extracto proteico total de la cepa Y2HGold transformada, usando un anticuerpo anti-cMyc para detectarla. Para el análisis, se

picaron colonias azules de 2-3 mm de diámetro de las placas SD/-Trp/X- α -Gal, y se sembraron en 5 ml de medio completo sin Trp, con kanamicina 50 μ g/ml, y se dejaron en agitación a 220-250 rpm durante 14-16 h a 28-30 $^{\circ}$ C. También se sembraron levaduras transformadas con el vector *mock* como control de nuestro análisis. Las levaduras se centrifugaron a 16.000 x g durante 15 s en tubos de 1,5 ml y se resuspendieron en 1 ml de solución precalentada a 60 $^{\circ}$ C de Urea/SDS (Urea 8 M, SDS 5% m/v, Tris-HCl pH 6,8 40 mM, EDTA 0,1 mM, azul bromofenol 0,4 mg/ml y β -mercaptoetanol 1%), suplementada con inhibidores de proteasas (PMSF 0,1 mM, quimostatina 5 μ g/ml, leupeptina 5 μ g/ml, antipaina 5 μ g/ml, pepstatina A 5 μ g/ml). A la solución de levaduras se le añadió el equivalente en volumen de granos finos de arena de mar (Panreac, Barcelona) y la mezcla se calentó durante 10 min a 70 $^{\circ}$ C, agitándola vigorosamente durante 1 min. El extracto de proteínas se recogió por centrifugación a 16.000 x g durante 5 min. Se utilizaron 20 μ l de cada muestra para su análisis mediante *Western Blotting* (ver apartado 3.3.7).

3.8.2.8. Emparejamiento de la cepa Y2HGold [pGBKT7-Rab18] con la librería de ADNc de tejido adiposo

El primer paso consiste en preparar un cultivo de la cepa *cebo* (Y2HGold [pGBKT7Rab18]) en medio líquido SD/-Trp. Para ello, se inoculó una colonia de levaduras Y2HGold [pGBKT7Rab18] de unos 2-3 mm de diámetro en 50 ml de medio líquido SD/-Trp y se dejó crecer a 30 $^{\circ}$ C durante 16-20 h hasta que la DO a 600 nm alcanzase un valor de 0,8. En este momento, se centrifugaron las levaduras a 1000 x g durante 5 min y se resuspendió la pella hasta una densidad superior a 1×10^8 células en SD/-Trp (4-5 ml). A continuación, se combinó la cepa *bait* con 1 ml de la librería de tejido adiposo previamente generada en un matraz estéril de 2 l y se añadieron 45 ml de 2X YPDA (con 50 μ g/ml de kanamicina). Esta mezcla se incubó a 30 $^{\circ}$ C durante 20-24 h en agitación muy suave (30-50 rpm). Transcurridas 20 h, se chequeó al microscopio (40x) la presencia de zigotos, que pueden observarse como estructuras trilobuladas. En caso de que no apareciesen se continuó con el emparejamiento durante 4 h más. Una vez que se observaron estas estructuras, la mezcla de emparejamiento se centrifugó a 100 x g durante 10 min. La pella resultante se resuspendió en 10 ml de medio líquido 0,5X YPDA/Kan y se sembró sobre placas SD/-Leu/-Trp/X- α -Gal/AbA (DDO/X/A) (200 μ l/placa), además de SD/-Trp, SD/-Leu y SD/-Leu/-Trp (DDO).

Las placas se dejaron crecer al menos durante 5 días, ya que el crecimiento en este punto es más lento. Las colonias positivas azules resultantes en las placas

DDO/X/A se inocularon en nuevas placas con medio SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/ X- α -Gal/AbA (QDO/X/A), más restrictivas, en las que se llevó a cabo la selección final. Los controles del emparejamiento (control #1, control #2 y control #3), se combinaron en 500 μ l de 2X YPDA durante 20-24 h a 30 °C en agitación a 200 rpm. De esta forma, el control positivo contenía una colonia de control #1 (procedente de una placa SD/-Leu) y otra de control #2 (procedente de una placa SD/-Trp) y el control negativo contenía una colonia de control #1 (procedente de una placa SD/-Leu) y otra de control #3 (procedente de una placa SD/-Trp). Las colonias se sembraron en las placas correspondientes (Tabla 5), manteniéndose 4-5 días de incubación a 30 °C.

Tabla 5. Emparejamiento de los controles #1, #2 y #3.

Control	Cruzamiento	Placas de siembra	Fenotipo
Positivo	Control #1 x Control #2	SD/-Leu	Blancas
		SD/-Trp	Blancas
		SD/-Leu/-Trp	Blancas
		SD/- Leu/-Trp/X- α -Gal/AbA	Azules
Negativo	Control #1 x Control #3	SD/-Leu	Blancas
		SD/-Trp	Blancas
		SD/-Leu/-Trp	Blancas
		SD/- Leu/-Trp/X- α -Gal/AbA	No crecimiento

3.8.2.9. Screening de las colonias positivas por PCR

El *screening* de la colonias positivas, es decir, aquéllas colonias azules que crecieron en el medio QDO/X/A, se hizo mediante PCR utilizando el kit comercial *Matchmaker™ Insert Check PCR Mix 2* (Clontech), que incluye los cebadores específicos que permiten la amplificación de los genes de la librería clonada en el vector pGADT7-Rec. Para el chequeo, se cogió una pequeña fracción de cada colonia, que se diluyó en 25 μ l de agua estéril y se mezcló con 25 μ l del kit de PCR; también se puso un control negativo de PCR consistente en agua estéril sin levaduras. Para la amplificación se utilizó un ciclo de 1 min a 94 °C, 30 ciclos de 10 s a 98 °C y un ciclo de 3 min a 68 °C. Terminada la PCR, se analizaron los fragmentos de ADN amplificados por electroforesis en gel de agarosa al 1,2% con bromuro de etidio y las bandas obtenidas se purificaron y se secuenciaron usando el cebador T7.

3.10. Análisis estadístico

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

En los estudios en los que se compararon únicamente dos grupos experimentales, se utilizó una prueba *t-Student* para datos paramétricos o la prueba de *Mann-Whitney* para datos no paramétricos. En estudios con más de dos grupos experimentales, el análisis estadístico se realizó empleando un análisis de varianza de una vía (*one way ANOVA*) seguido de la prueba de comparación de rangos múltiples de Newman-Keuls. Los análisis se realizaron con el programa GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE.UU.). Las diferencias entre los grupos experimentales se consideraron estadísticamente significativas a partir de un nivel de confianza superior al 95% ($P < 0,05$).

RESULTADOS

4.1 Rab18 se asocia preferentemente a las LDs de menor tamaño en condiciones de ayuno

En estudios previos se ha demostrado que Rab18 se asocia a la superficie de las LDs en diversos tipos celulares, incluyendo células 3T3-L1 diferenciadas (Brasaemle *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2005; Ozeki *et al.*, 2005) y esta asociación aumenta en condiciones de sobreexpresión de la GTPasa (Ozeki *et al.* 2005), así como en respuesta a estímulos lipolíticos (Martin *et al.*, 2005; Pulido *et al.*, 2011) y lipogénicos (Pulido *et al.*, 2011). En el presente estudio hemos confirmado la relación de Rab18 con las LDs en adipocitos y hemos profundizado en los mecanismos moleculares que subyacen en el reclutamiento de la GTPasa hacia las LDs. Específicamente, nuestros estudios de doble inmunocitoquímica y microscopía confocal han mostrado que, ya en condiciones basales, existe cierta asociación de Rab18 endógena con la superficie de las LDs. Como se muestra en la Fig. 18A, la inmunoseñal de Rab18 se concentra en ciertos puntos discretos de la superficie de las LDs que coinciden espacialmente con el inmunomarcaje para la proteína residente de estos orgánulos, PLIN (Wolins *et al.*, 2006b; Heid *et al.*, 2013). Más aún, tal como se ha descrito previamente (Martin *et al.*, 2005; Pulido *et al.*, 2011), tanto el tratamiento de las células con un potente inductor de la lipogénesis, la insulina, como con un estimulador de la lipólisis, el agonista de receptores β -adrenérgicos isoproterenol, provocaron aumentos importantes en la cantidad de Rab18 que decora la superficie de las LDs y, por tanto, incrementos significativos en el índice de colocalización con respecto a PLIN. Cuantitativamente, y como refleja el valor medio del índice de colocalización de la señal de Rab18 y de PLIN en la superficie de las LDs que se muestra en la Fig. 18B, el reclutamiento de Rab18 hacia las gotas en respuesta a insulina e isoproterenol aumentaron un 102% y un 98% con respecto a condiciones basales. Sin embargo, de todos los tratamientos ensayados en este estudio, fue la privación de suero durante 24 h la condición que provocó un mayor reclutamiento de Rab18 hacia las LDs. Así, la ausencia de suero, además de inducir una disminución clara del tamaño de las LDs y un aumento concomitante del número de éstas, produjo un fuerte incremento de la colocalización de Rab18 con PLIN (Fig. 18A). Numéricamente, la asociación de Rab18 a las LDs aumentó un 429% con respecto a la situación control (Fig. 18B).

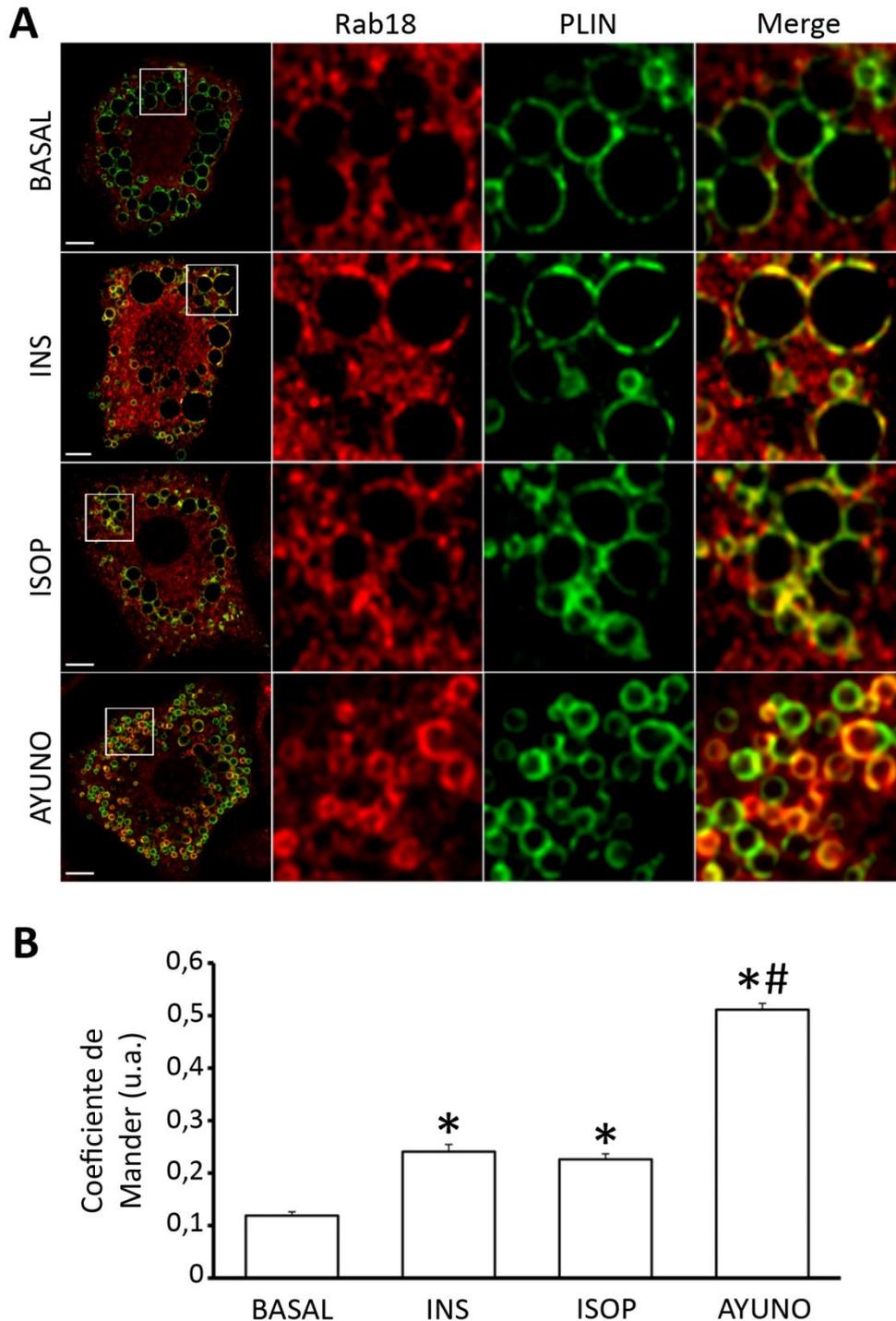


Figura 18. Colocalización de Rab18 (rojo) con PLIN (verde) en adipocitos 3T3-L1. (A) Imágenes representativas de microscopía confocal de células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos y sometidas a tratamientos de 2 h con insulina (100 nM), isoproterenol (10 μ M), o incubadas durante 24 h en ausencia de suero. Las células fueron posteriormente procesadas para inmunofluorescencia con los anticuerpos anti-Rab18 y anti-PLIN. Barra de escala, 5 μ m. (B) Coeficiente de colocalización medio de las señales fluorescentes. Se analizaron al menos 150 gotas lipídicas de 10 células por grupo experimental. *, $P < 0,001$ vs. condiciones basales. #, $P < 0,001$ vs. tratamientos con insulina e isoproterenol.

Puesto que se ha demostrado que PLIN está presente en la superficie de la población total de LDs en células 3T3-L1 (Wolins *et al.*, 2006b), pudimos a continuación comparar el porcentaje de LDs con presencia de Rab18 entre las distintas condiciones experimentales investigadas. Este análisis reveló que, en condiciones basales, el 49% de las LDs presentaban Rab18 en su superficie, mientras que este porcentaje aumentó hasta alcanzar el 79% y el 73% de la población total de gotas tras la estimulación con insulina o isoproterenol, respectivamente. De nuevo, cabe destacar el potente efecto del ayuno prolongado sobre el reclutamiento de Rab18 hacia estos orgánulos. En concreto, la privación de suero indujo el acercamiento de Rab18 a la casi totalidad de las LDs (92%). Estos resultados, junto con el análisis de colocación de Rab18 y PLIN, indican que todos los estímulos ensayados no sólo inducen un mayor reclutamiento de la GTPasa a aquellas gotas que ya la presentaban en su superficie en condiciones basales, sino también un incremento en el número de LDs positivas para Rab18.

Por otra parte, investigamos si el tamaño de las LDs influye en el reclutamiento de Rab18 inducido por insulina, isoproterenol o ayuno prolongado. Para ello, en primer lugar analizamos los cambios en el tamaño de las LDs inducidos por las distintas condiciones experimentales, lo que reveló que, de acuerdo a lo descrito previamente (Bergreen *et al.*, 2009; Ariotti *et al.*, 2012), la insulina indujo un aumento, mientras que el isoproterenol provocó una disminución del área media de estos orgánulos ($4,80 \pm 0,42$ vs. $7,34 \pm 0,78$ y $2,04 \pm 0,25 \mu\text{m}^2$ en condiciones basales y tras el estímulo con insulina o con isoproterenol, respectivamente) (Fig. 19). El ayuno prolongado fue de nuevo la condición que afectó de manera más potente a la morfología de las gotas, provocando una disminución de su superficie del 71,6% con respecto a las condiciones basales ($4,80 \pm 0,42$ vs. $1,36 \pm 0,10 \mu\text{m}^2$ en presencia o ausencia de suero, respectivamente) (Fig. 19).

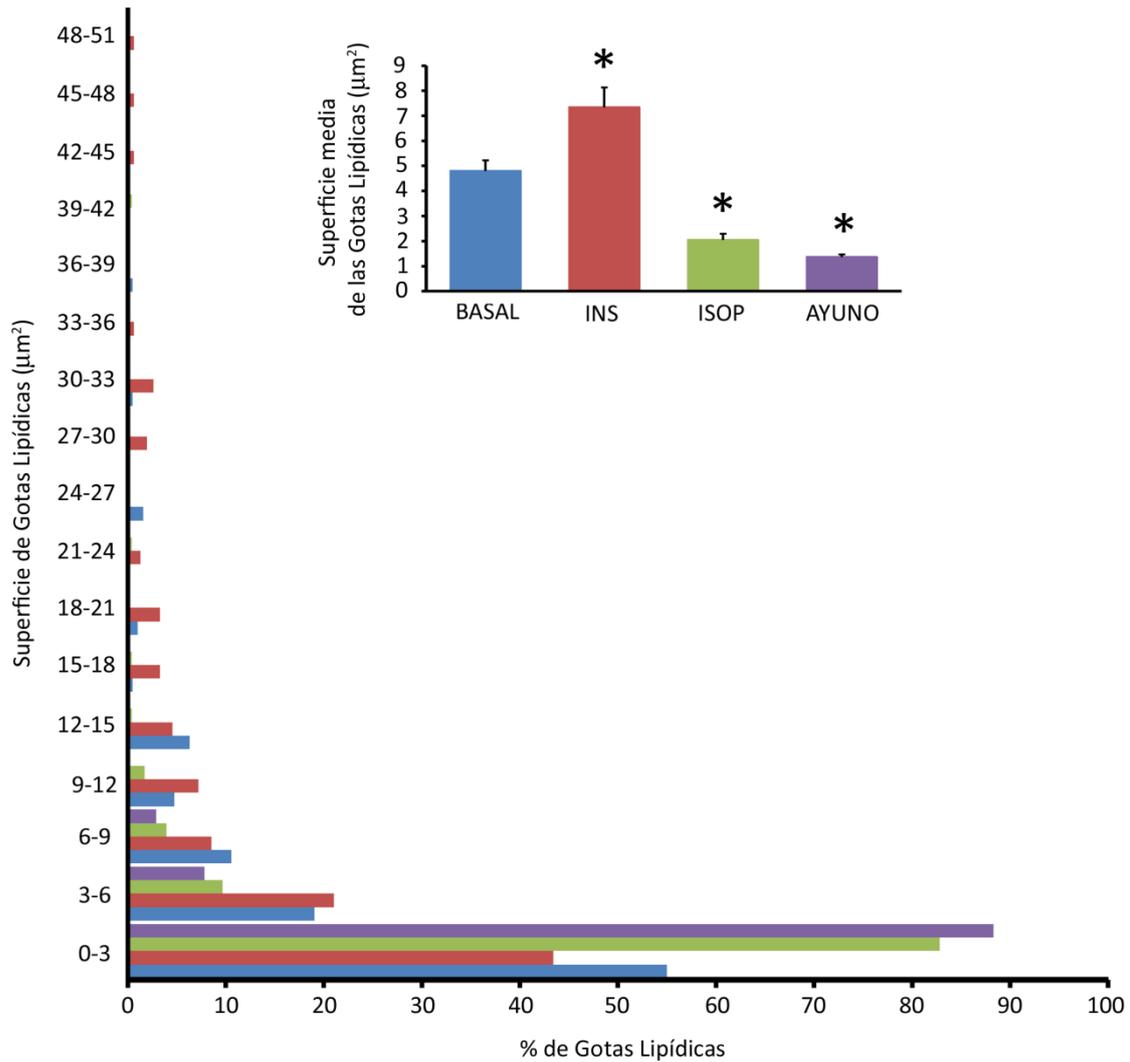


Figura 19. Efecto de la insulina (INS), el isoproterenol (ISO) y la deprivación de suero (AYUNO) en la distribución de tamaño de las LDs en adipocitos 3T3-L1. Área media de las LDs en adipocitos 3T3-L1 en condiciones basales y tras estimulación durante 2 h con insulina (100 nM) o isoproterenol (10 μM), y tras 24 h de ayuno. *, $P < 0,001$ vs. condiciones basales. Distribución de la población de las LDs en función de su tamaño en condiciones basales y en respuesta a los tratamientos.

Para profundizar en estos efectos y relacionarlos con la presencia o no de Rab18 en la superficie de las gotas, también calculamos la distribución de frecuencias del índice de colocalización de Rab18 y PLIN en todas las LDs incluidas en el análisis. Como se puede observar en la Fig. 20, todos los tratamientos provocaron un desplazamiento de la distribución hacia valores de mayor índice de colocalización, lo que está de acuerdo con los valores medios totales presentados anteriormente. Además, este análisis reveló que Rab18 tiende a acumularse en las LDs de menor tamaño en respuesta a los diferentes estímulos lipogénicos y lipolíticos. En concreto, tras los estímulos con insulina o isoproterenol, o la deprivación de suero, los grupos

que presentaron coeficientes de Mander por encima de 0,5 u.a. incluyeron LDs con tamaños comprendidos entre 0,5 y 0,8 μm^2 , valores muy por debajo del área media de la población total de gotas tanto en condiciones basales como bajo las distintas condiciones experimentales (Fig. 20).

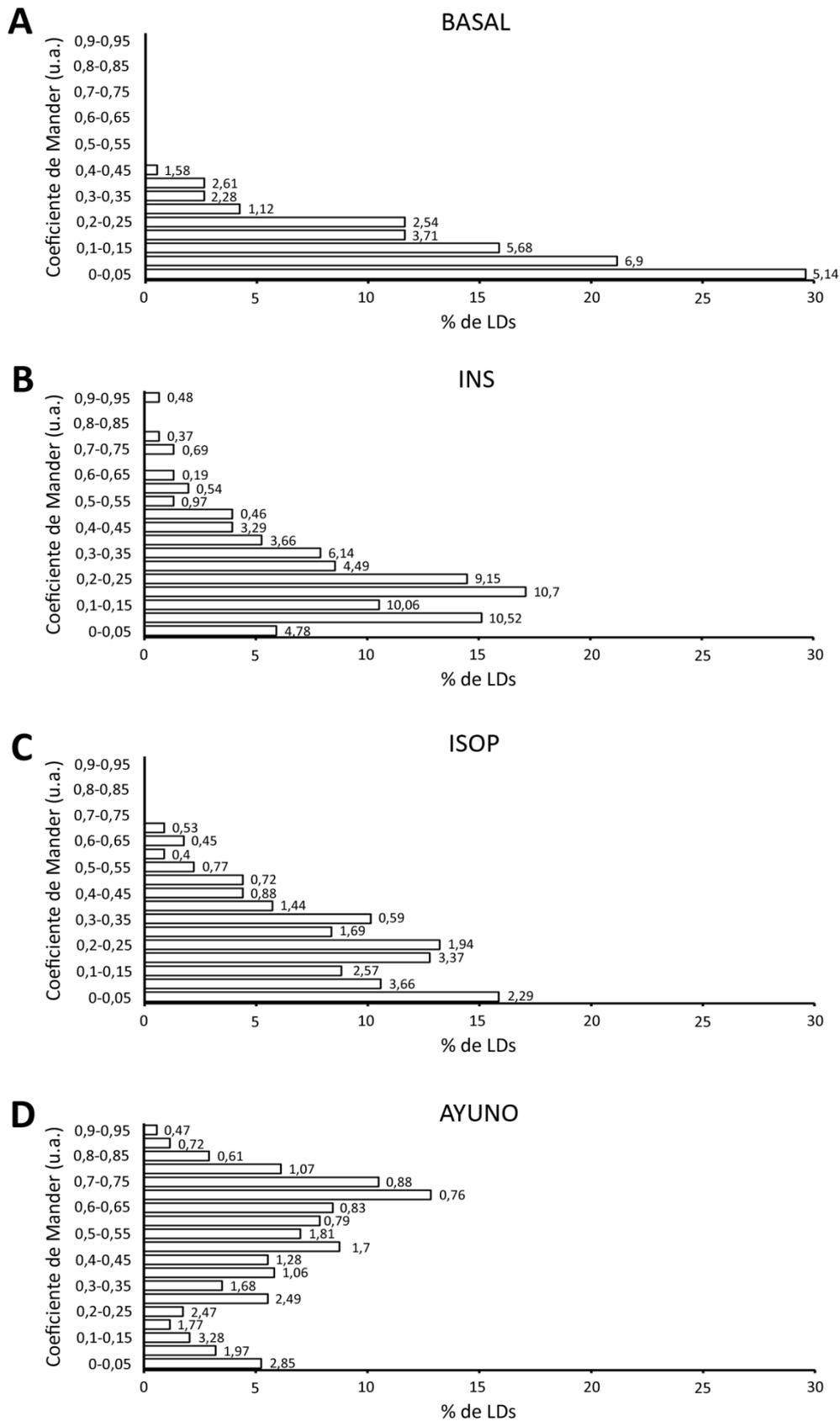


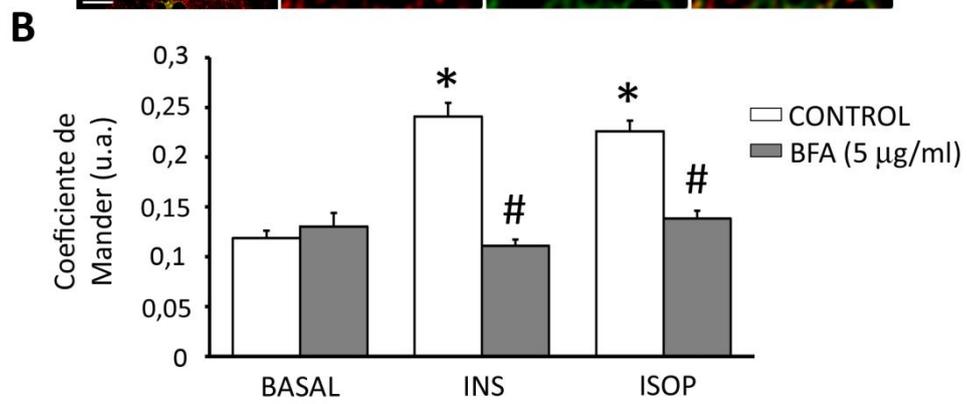
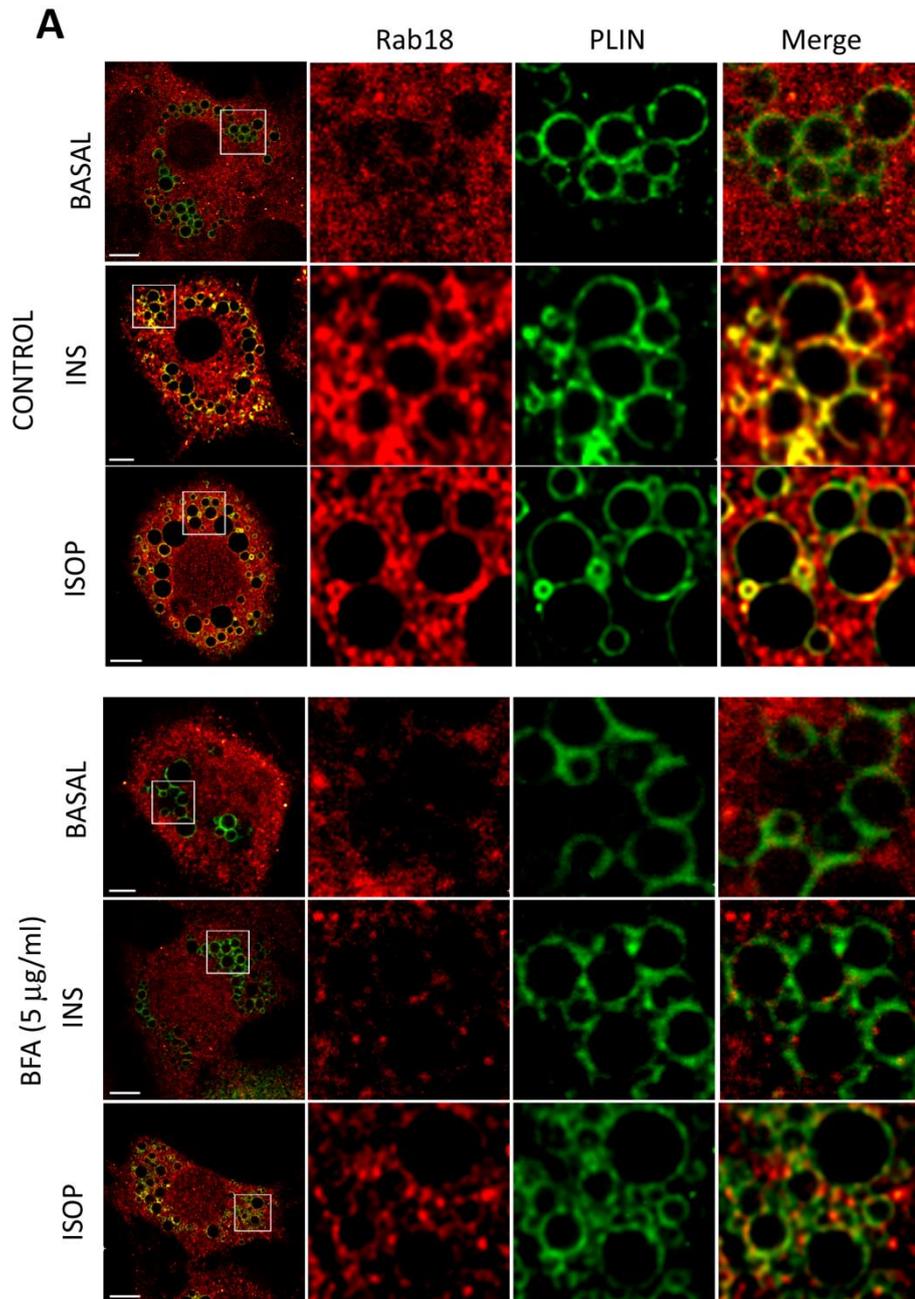
Figura 20. Distribución de colocación de Rab18 y PLIN en adipocitos 3T3-L1 en condiciones basales (A), tras estimulación con insulina 100 nM (B), isoproterenol 10 μM (C), o tras ayuno prolongado (D). Se cuantificó el porcentaje de LDs dentro de cada intervalo de coeficiente de

colocalización entre ambas señales fluorescentes y se calculó el área media de las LDs incluidas en cada uno de los intervalos.

En resumen, el conjunto de estos resultados señalan al ayuno prolongado como la condición que provoca un mayor efecto no sólo en la morfología de las LDs, sino también como el mayor inductor del reclutamiento de Rab18 a su superficie. Además, sugieren que tanto estímulos lipogénicos como lipolíticos promueven la asociación de la GTPasa a la población total de LDs, pero este efecto es más prominente en las gotas de menor tamaño.

4.2. La asociación de Rab18 a la superficie de las LDs depende de la integridad del eje RE-Golgi

En estudios previos se ha propuesto que ciertas proteínas que forman parte de la cubierta de las LDs, como ATGL y ADRP, son transportadas desde las membranas del Golgi en un proceso dependiente de COPI, COPII y de sus proteínas reguladoras (Beller *et al.*, 2008; Soni *et al.*, 2009). Para analizar si Rab18 utiliza un mecanismo parecido al propuesto para estas proteínas, evaluamos el efecto que tiene la interrupción del tráfico vesicular RE-Golgi sobre su translocación a gotas en respuesta a estímulos lipogénicos y lipolíticos. Para ello, incubamos adipocitos 3T3-L1 con brefeldina A (BFA), que inhibe este transporte, lo que resulta en la disgregación de las membranas del complejo de Golgi y la acumulación de proteínas en las membranas del RE (Soni *et al.*, 2009). Tras el tratamiento, las células fueron incubadas con insulina o isoproterenol durante 2 h. Como se puede observar en la Fig. 21A, la presencia de Rab18 en la superficie de las LDs en células no estimuladas no fue afectada por el tratamiento con BFA (CM $0,119 \pm 0,007$ vs. $0,135 \pm 0,013$ u.a. en ausencia o presencia de BFA, respectivamente). Sin embargo, la exposición a BFA sí modificó el patrón característico de distribución de Rab18 en torno a las gotas inducido por insulina o isoproterenol. En concreto, el tratamiento con BFA bloqueó por completo el reclutamiento de la GTPasa a las LDs inducido por estímulos lipogénicos y por estímulos lipolíticos (como muestran los índices de colocalización representados en la Fig. 21B).



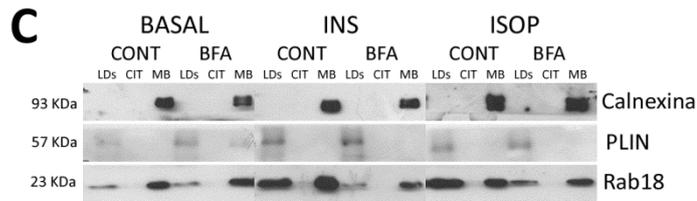


Figura 21. Localización intracelular de Rab18 en adipocitos 3T3-L1 tras la disrupción del eje RE-Golgi. (A) El índice de colocalización entre Rab18 y PLIN se evaluó en adipocitos 3T3-L1 no tratados (paneles superiores) o tratados con BFA durante 30 min (paneles inferiores) tanto en condiciones basales, como tras estimulación durante 2 h con insulina (100 nM) o isoproterenol (10 μ M). Barra de escala, 5 μ m. (B) Coeficiente de colocalización medio que muestran ambas señales fluorescentes. *, $P < 0,001$ vs. células control en condiciones basales. #, $P < 0,001$ vs. células control tras el tratamiento con insulina o isoproterenol. (C) La distribución intracelular de Rab18 se analizó mediante fraccionamiento subcelular y *Western Blotting*.

Estos estudios de microscopía confocal fueron complementados con análisis bioquímicos que tuvieron como fin evaluar la cantidad de Rab18 en fracciones proteicas enriquecidas en distintas fracciones celulares. Como se muestra en la Fig. 21C, en ausencia de BFA la inmunoreactividad de Rab18 apareció asociada a las fracciones enriquecidas en LDs y en membranas celulares, estando ausente en la fracción citosólica, mientras que este patrón de distribución no fue alterado cuando las células se expusieron a BFA (panel izquierdo), lo que está de acuerdo con los resultados de inmunofluorescencia. En cambio, esta droga provocó una disminución considerable de la cantidad de GTPasa asociada a la fracción de LDs con respecto a la que aparece en la misma fracción obtenida a partir de células tratadas con insulina (panel central) o isoproterenol (panel derecho).

En conjunto, estos resultados sugieren que el tráfico vesicular entre el complejo de Golgi y el RE es necesario para el reclutamiento de Rab18 hacia las LDs inducido tanto por estímulos lipogénicos como lipolíticos.

4.3. Papel del citoesqueleto en la distribución intracelular de Rab18 en adipocitos

Dada la relación de Rab18 con el tráfico intracelular (Vazquez-Martinez *et al.*, 2007; Dejgaard *et al.*, 2009) y la implicación del citoesqueleto en este tráfico (Granger *et al.*, 2014), analizamos la relación espacial de las LDs marcadas con Rab18 (Rab18-LDs) con distintos elementos del citoesqueleto celular. En primer lugar, se estudió la colocalización de las Rab18-LDs y los filamentos de actina, que fueron marcados con faloidina-Alexa488. Como se muestra en la Fig. 22A, los filamentos de actina se localizan predominantemente en el córtex celular de células 3T3-L1 diferenciadas (Yang *et al.*, 2013). Por su parte, la inmunoreactividad de Rab18 apareció a cierta distancia de la membrana plasmática, no mostrando una coincidencia espacial evidente con la red cortical de actina, tal como puede observarse en el gráfico de correlación (Fig. 22B) que representa el análisis de intensidades de fluorescencia de ambos canales pixel por pixel.

En consonancia con la ausencia de relación espacial entre las Rab18-LDs y la red cortical de actina, la desorganización de ésta mediante el tratamiento con latrunculina B no provocó cambios en la distribución celular de las gotas ni alteró la presencia de Rab18 en su superficie (Fig. 22C).

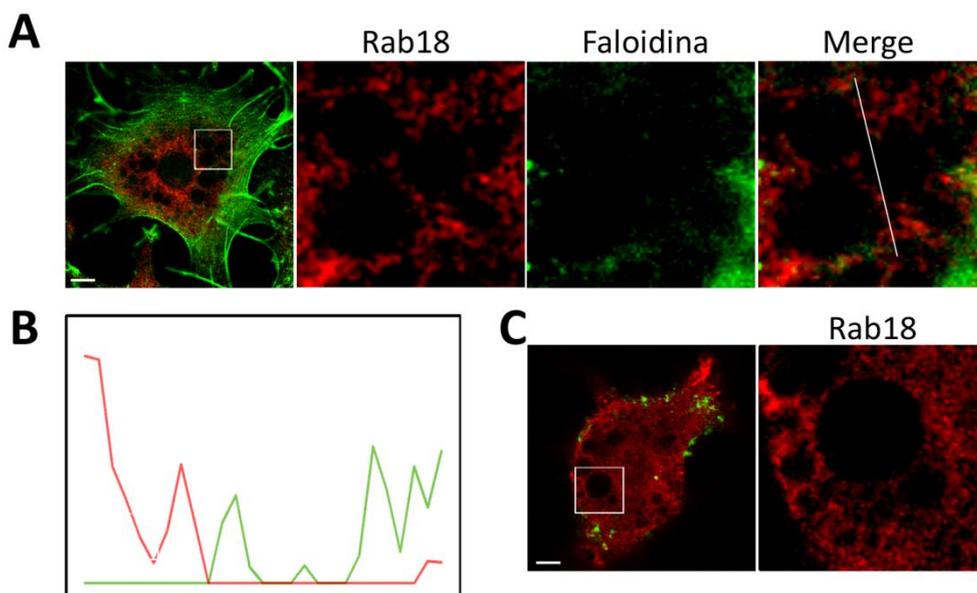


Figura 22: Análisis de la relación espacial entre las Rab18-LDs y los filamentos de actina. (A) Imagen de microscopía confocal representativa de una célula 3T3-L1 inmunoteñida para Rab18 y marcada con la faloidina-Alexa488. Barras de escala, 5 μ m. (B) Gráfico de correlación de las señales fluorescentes a lo largo de la línea punteada. (C) Distribución de Rab18 (rojo) tras la disrupción de citoesqueleto de actina (verde) con latrunculina B 10 μ M (30 min). Barras de escala, 5 μ m.

También evaluamos la relación entre las Rab18-LDs y la red de microtúbulos. Como se observa en la Fig. 23A, que muestra una célula 3T3-L1 doblemente inmunomarcada (paneles superiores) e imágenes renderizadas de la misma (paneles inferiores), las Rab18-LDs se encuentran a menudo rodeadas por haces de microtúbulos, que, en algunos puntos, coinciden con el inmunomarcaje de Rab18. El análisis de intensidades de fluorescencia de ambos canales pixel por pixel (gráfica de correlación) confirmó esta asociación (Figura 23B).

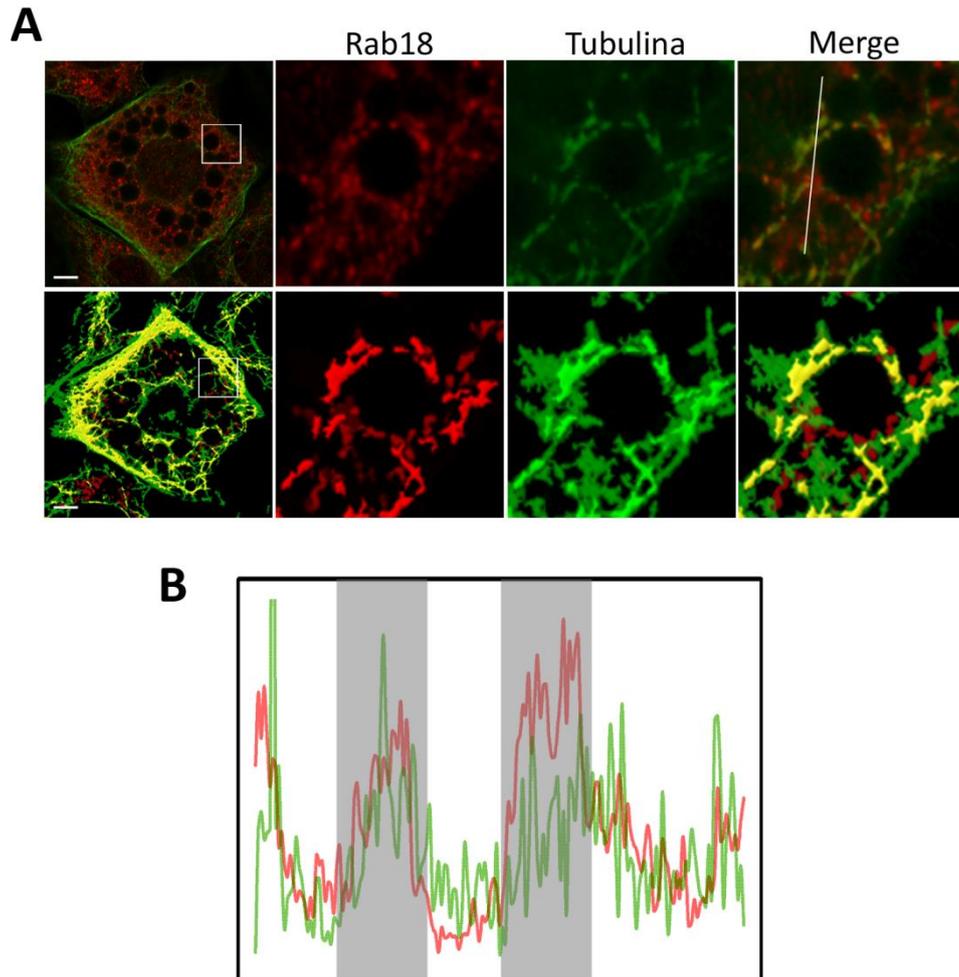


Figura 23. Análisis de la relación espacial entre las Rab18-LDs y la red de microtúbulos. (A) El panel superior representa una imagen de microscopía confocal representativa de una célula 3T3-L1 inmunoteñida para Rab18 y β -tubulina (izquierda) y el detalle de la distribución de ambas señales alrededor de una gota lipídica (derecha). El panel inferior muestra la imagen renderizada mediante el uso del software Imaris 7.0. Barra de escala, 5 μ m. (B) Gráfico de correlación de señales fluorescentes a lo largo de la línea punteada.

Para profundizar en la relación que mantienen las Rab18-LDs y la red de microtúbulos, se investigó el efecto de la desestabilización de microtúbulos sobre la distribución intracelular de Rab18 mediante el tratamiento de adipocitos 3T3-L1

durante 1 h con nocodazol (Modrianský y Dvorák 2005). La inmunotinción de la red de microtúbulos con anti- β -tubulina confirmó que dicho tratamiento induce la despolimerización completa de esta red de citoesqueleto (Fig. 24).

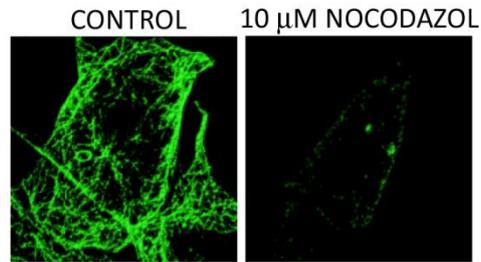
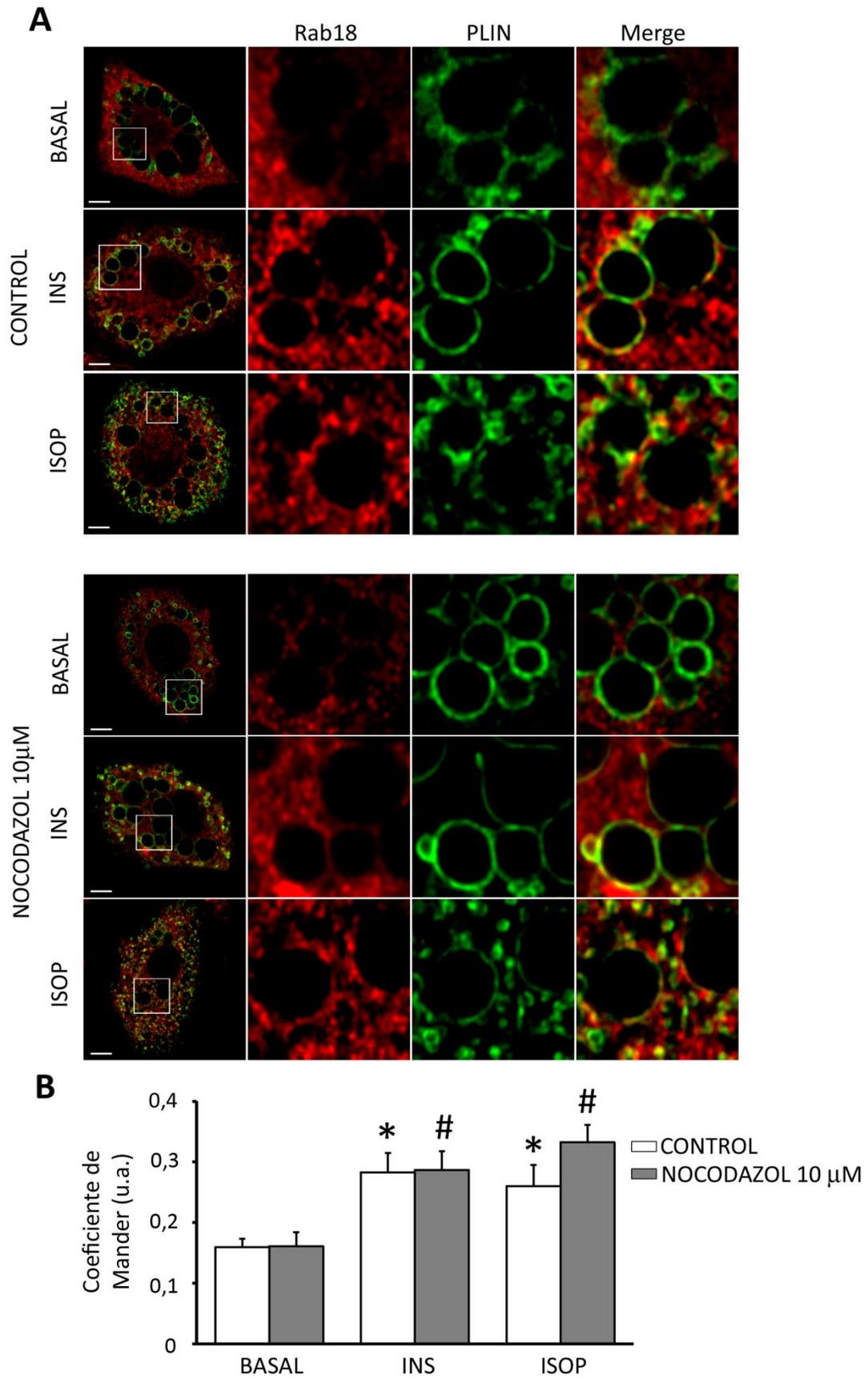


Figura 24. Efecto del nocodazol (10 μ M, 1 h) sobre la red de microtúbulos en adipocitos 3T3-L1.

En las células tratadas con nocodazol, no observamos modificaciones en cuanto a la asociación de Rab18 a las LDs en condiciones basales (Fig. 25A), manteniéndose en éstas el mismo grado de colocalización entre Rab18 y PLIN (CM $0,159 \pm 0,014$ vs. $0,160 \pm 0,020$ u.a. en ausencia o presencia de nocodazol, respectivamente). De manera similar, la administración de nocodazol tampoco afectó al reclutamiento de Rab18 inducido por insulina o isoproterenol (Fig. 25B).



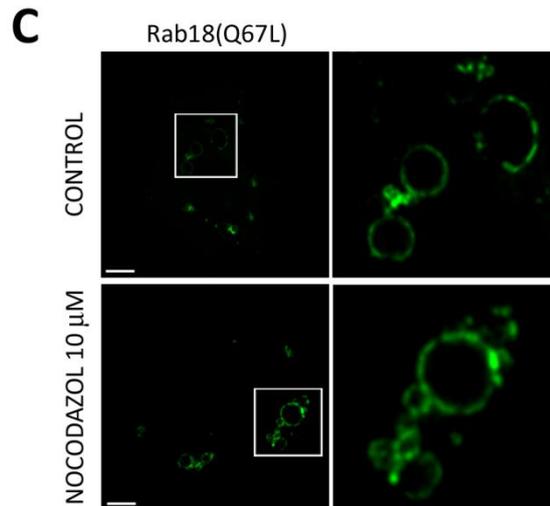


Figura 25. Relación espacial de Rab18 con el citoesqueleto de microtúbulos. (A) Colocalización entre Rab18 (rojo) y PLIN (verde) en adipocitos 3T3-L1 no tratados (panel superior) y tratados 1 h con nocodazol 10 μ M (panel inferior) en ausencia o presencia de insulina (100 nM, 2 h) o isoproterenol (10 μ M, 2 h). Barra de escala, 5 μ m. (B) Coeficiente de colocalización medio que muestran ambas señales fluorescentes. *, $P < 0,001$ vs. células control en condiciones basales. #, $P < 0,001$ vs. células tratadas con nocodazol en condiciones basales. (C) Distribución intracelular del mutante constitutivamente activo de Rab18 [Rab18(Q67L)] en ausencia (paneles superiores) o presencia de nocodazol 10 μ M (paneles inferiores). Barra de escala, 5 μ m. En las imágenes de la derecha se muestra la imagen ampliada de la región marcada con el recuadro blanco.

Por otra parte, la desestabilización de microtúbulos tampoco modificó la localización del mutante activo de Rab18, [Rab18(Q67L)], que mostró su distribución intracelular típica alrededor de la superficie de las LDs (Fig. 25C). El conjunto de estos resultados sugiere que el reclutamiento de Rab18 a la superficie de las LDs es independiente del citoesqueleto de microtúbulos.

4.4. Relación espacial y funcional de las Rab18-LDs con otros orgánulos implicados en metabolismo lipídico

La relevancia del RE en la biogénesis de las LDs y en la composición proteica de su cubierta está claramente establecida (Zehmer *et al.*, 2009; Walther y Farese, 2012). Además de esta relación con RE, las LDs también interaccionan con otros orgánulos implicados en el metabolismo lipídico, bien por su cooperación en la oxidación de ácidos grasos o por su participación en la síntesis de lípidos: las mitocondrias y los peroxisomas. Por ello, a continuación investigamos la relación espacial y funcional existente entre las Rab18-LDs y estos orgánulos.

4.4.1. Retículo Endoplásmico

En un estudio previo realizado en nuestro laboratorio se demostró que el tratamiento con insulina o isoproterenol incrementa la colocalización de las Rab18-LDs con el RE en adipocitos 3T3-L1 (Pulido *et al.*, 2011). En el presente estudio, hemos profundizado en la dinámica temporal de dicha asociación y en los factores moleculares involucrados. En primer lugar, analizamos la relación espacial que mantiene el RE con las LDs. Para ello, las células fueron cargadas con dos marcadores fluorescentes de tipo BODIPY [uno que presenta gran afinidad por los lípidos apolares contenidos en las gotas lipídicas (*BODIPY493/503*) y un segundo que tiñe canales de K⁺ de las membranas del RE (*ER-Tracker*)] y a continuación fueron observadas mediante microscopía confocal. En la Fig. 26 se muestra una imagen renderizada representativa de la relación espacial entre ambos orgánulos. Como se puede observar, las LDs se localizan en zonas cercanas al RE y, en muchas ocasiones, se encuentran envueltas por membranas de este orgánulo. La relación espacial encontrada en este estudio entre estos orgánulos está de acuerdo con las observaciones de microscopía electrónica realizadas en estudios previos (Novikoff *et al.*, 1980; Ozeki *et al.*, 2005).

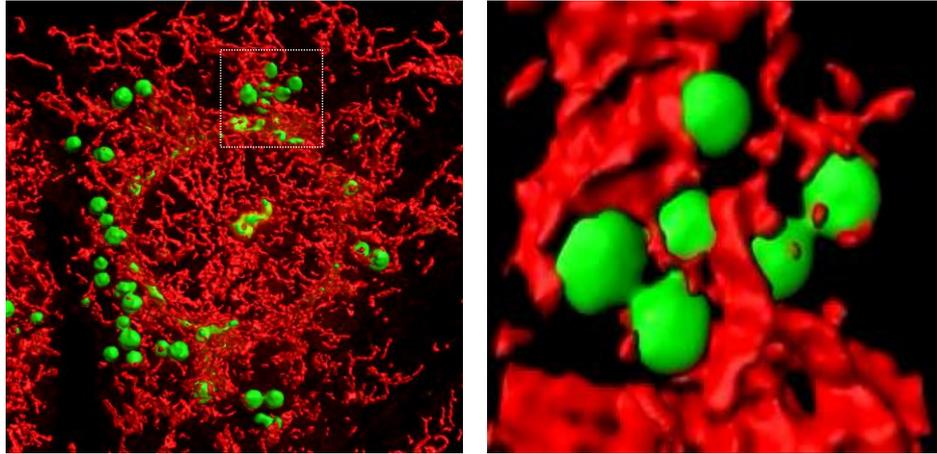


Figura 26. Imagen renderizada de un adipocito 3T3-L1 teñido con marcadores vitales de RE (*ER-Tracker*, rojo) y de LDs (*BODIPY493/503*, verde).

A continuación, monitorizamos en células vivas y a tiempo real la dinámica de ambos orgánulos en respuesta a un estímulo lipogénico, para lo que electroporamos adipocitos 3T3-L1 con el vector de expresión GFP-Rab18 y los expusimos al marcador vital *ER-Tracker*. La Fig. 27A muestra imágenes de la distribución intracelular de RE en relación a las LDs y en las Fig. 27B y Fig. 27C se representan los valores de coeficiente de Mander medios a lo largo del tiempo y el índice de colocalización total durante el periodo basal y a lo largo del tratamiento con insulina, respectivamente. La secuencia completa de imágenes se muestra en el vídeo 1 incluido en la Información Suplementaria. El análisis de los resultados obtenidos mediante videomicroscopía reveló que, del total de Rab18-LDs analizadas, el 66% aumentó significativamente su grado de colocalización con RE ($62,081 \pm 3,035$ vs. $86,660 \pm 7,869$ u.a. en condiciones basales y tras estimulación con insulina, respectivamente), mientras que el 33% restante no modificó el grado de colocalización con RE tras el estímulo. Estos resultados sugieren que la insulina produce un acercamiento inmediato de las Rab18-LDs y el RE, pero que esto sólo ocurre con una subpoblación particular de gotas.

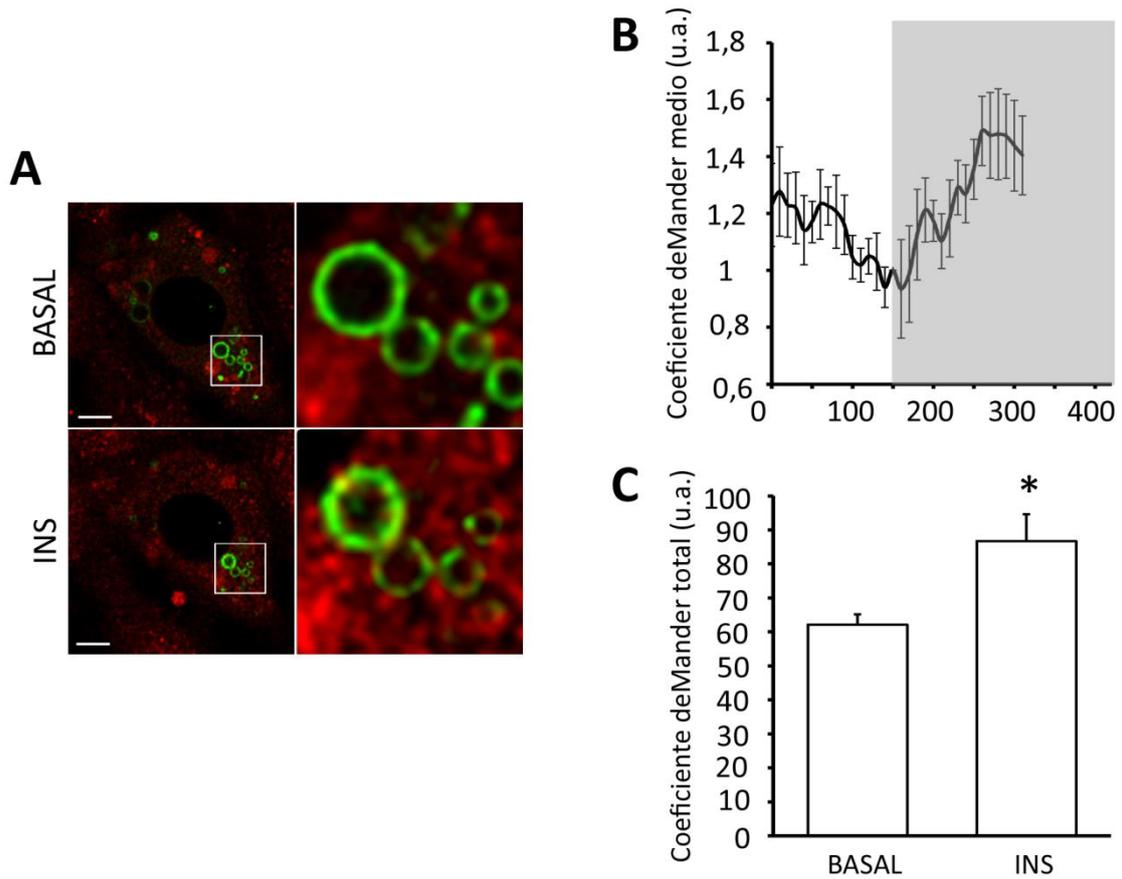


Figura 27. Videomicroscopía en tiempo real en adipocitos 3T3-L1 transfectados con GFP-Rab18 y teñidos con el marcador vital de RE, *ER-tracker*, monitorizados bajo condiciones basales y tras estimulación con insulina (100 nM). (A) Imágenes representativas de adipocitos antes y después de la estimulación lipogénica. Barra de escala 5 μ m. (B) Representación gráfica de la variación del valor medio del coeficiente de Mander en las LDs normalizado al punto de inyección del tratamiento con respecto al tiempo. (C) Representación del valor medio el área bajo la curva de los coeficientes de Mander antes y después del tratamiento.

En estudios recientes se ha demostrado la existencia de regiones de la membrana de RE enriquecidas en enzimas lipogénicas (Kassan *et al.*, 2013), lo que nos llevó a pensar que el acercamiento de membranas del RE y Rab18-LDs inducido por la insulina podría ocurrir en dichas zonas. Para estudiar esta posibilidad, utilizamos como marcador la enzima DGAT2, encargada de catalizar el último paso en la síntesis de triglicéridos y que está enriquecida en zonas definidas del RE (revisado en Liu *et al.*, 2012), y comparamos su distribución intracelular en relación de las Rab18-LDs tras la administración de insulina. Este ensayo se realizó a diferentes tiempos de tratamiento (2 y 4 h) y el estudio de colocalización se llevó a cabo sólo con aquellas LDs en las que se observó claramente la presencia de Rab18 en su superficie (CM > 0,1, ver Material y Métodos). El análisis de las imágenes reveló que la inmunoseñal de DGAT2, que tiene

una distribución compatible con su asociación al RE en este tipo celular, raramente colocalizó con Rab18 en condiciones basales, como se muestra en la imagen representativa de la Fig. 28A (paneles superiores). De acuerdo con esta observación, el grado de colocalización entre ambas proteínas bajo condiciones basales fue reducido y la exposición de las células a insulina durante 2 h prácticamente no modificó este índice de colocalización (Fig. 28A paneles centrales y Fig. 28B). Por el contrario, el tratamiento con insulina durante 4 h sí indujo un incremento significativo en el índice de colocalización entre Rab18 y DGAT2 (Fig. 28A paneles inferiores y Fig. 28B), lo que sugiere que existe un acercamiento de ambos orgánulos durante estímulos lipogénicos prolongados.

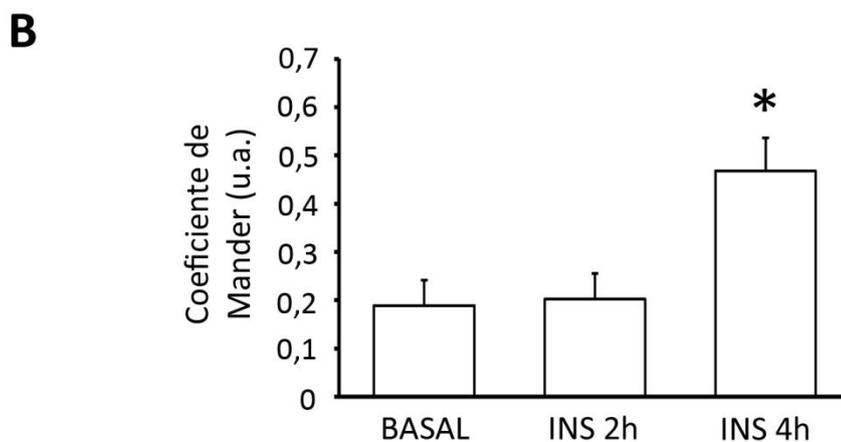
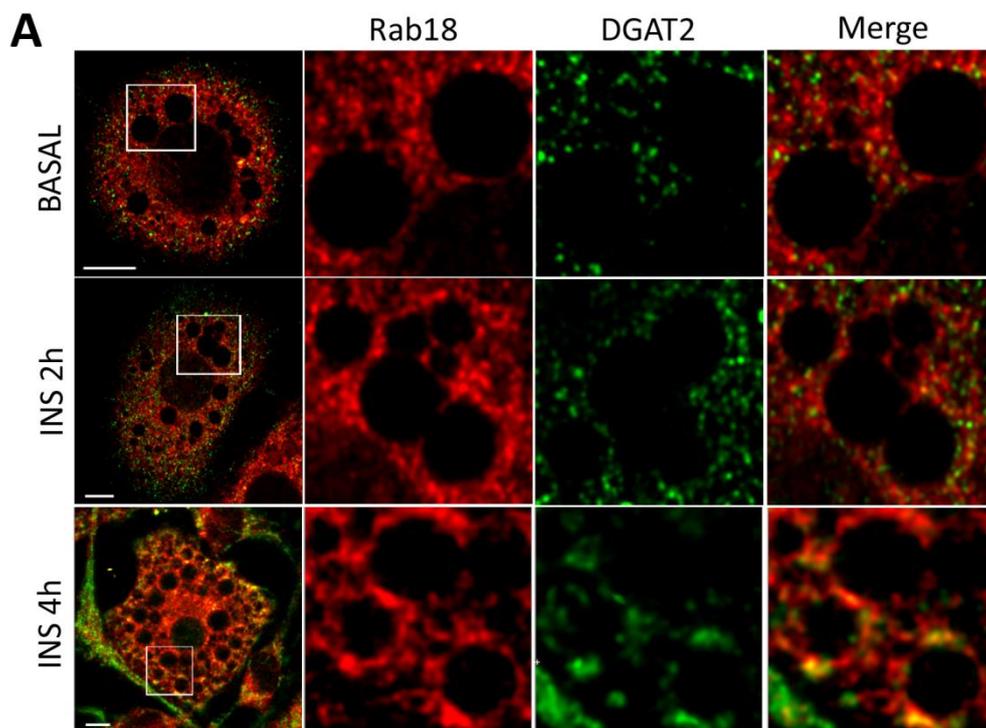


Figura 28. Estudio de colocalización de Rab18 (rojo) con la enzima lipogénica DGAT2 (verde) en adipocitos 3T3-L1. (A) Imágenes representativas de microscopía confocal de células 3T3-L1 con Insulina (100 nM) durante 2 ó 4 h. Barra de escala, 5 μ m. (B) Coeficiente de colocalización medio que muestran ambas señales fluorescentes. *, $P < 0,01$ vs. células basales.

De forma similar, estudiamos la relación entre Rab18 y DGAT2 tras la exposición lipolítica a isoproterenol durante 2 y 4 h. Los resultados del análisis de colocalización revelaron que, a 2 h, la colocalización entre ambas proteínas tendió a disminuir, aunque no de manera significativa (Fig. 29A paneles centrales y Fig. 29B). Sin embargo, al igual que lo acontecido en el caso de insulina, el tratamiento con isoproterenol durante 4 h incrementó significativamente el índice de colocalización entre Rab18 y DGAT2 (Fig. 29A paneles inferiores y Fig. 29B).

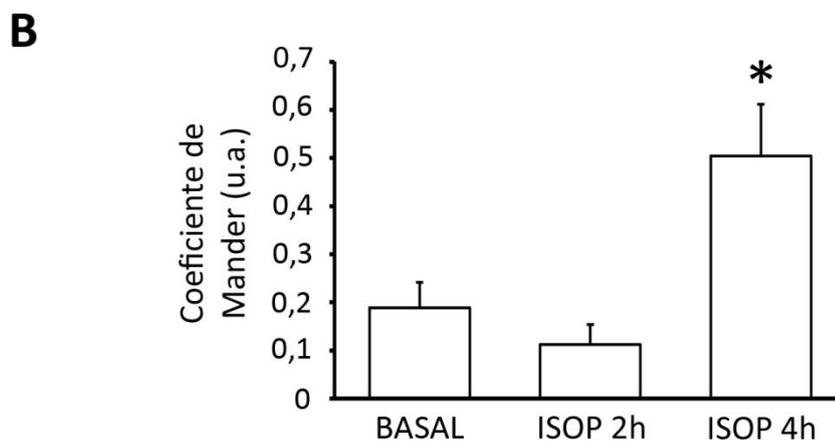
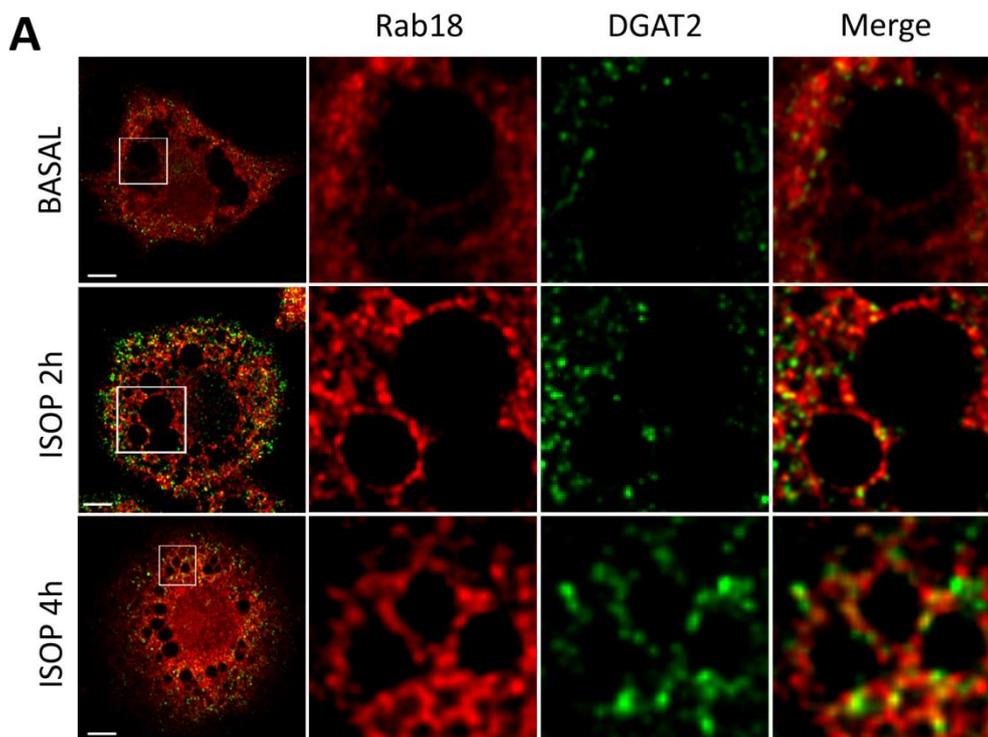


Figura 29. Estudio de colocalización de Rab18 (rojo) con DGAT2 (verde) en adipocitos 3T3-L1. (A) Imágenes representativas de microscopía confocal de células 3T3-L1 expuestas a isoproterenol (10 μ M) durante 2 ó 4 h. Barra de escala, 5 μ m. (B) Coeficiente de colocalización medio que muestran ambas señales fluorescentes. *, $P < 0,01$ vs. células basales.

Estos resultados indican que tanto los estímulos lipogénicos como lipolíticos aumentan la relación espacial de las Rab18-LDs y zonas del RE enriquecidas en DGAT2.

4.4.2. Mitocondrias

Para analizar el movimiento de las mitocondrias con respecto a las LDs que presentan GFP-Rab18 en su superficie llevamos a cabo una aproximación experimental similar a la descrita en el apartado anterior. Concretamente, monitorizamos células 3T3-L1 electroporadas con el vector GFP-Rab18 y marcadas con el marcador vital de mitocondrias *Mitotracker*, antes y después de la administración de insulina 100 nM o isoproterenol 10 μ M y evaluamos la evolución del coeficiente de colocalización entre los dos marcadores en respuesta a los tratamientos. En las Figs. 30A y 30D, así como en los vídeos 2 y 3 incluidos en la Información Suplementaria, se muestran ejemplos de LDs en las que pueden observarse las mitocondrias formando redes y Rab18 localizado alrededor de las LDs. El análisis de colocalización entre ambas señales reveló que, bajo condiciones basales, existe cierta colocalización entre las Rab18-LDs y las mitocondrias. La exposición a ambos tratamientos incrementó el grado de colocalización entre estos orgánulos, aunque con diferente magnitud. En respuesta a insulina, el 47% del total de LDs analizadas incrementó su colocalización con mitocondrias ($57,358 \pm 0,864$ vs. $73,544 \pm 6,859$ u.a. en condiciones basales y tras la estimulación, respectivamente), mientras que un 67% respondió al tratamiento con isoproterenol presentando un incremento significativo en el grado de colocalización ($59,308 \pm 2,143$ vs. $83,742 \pm 6,069$ u.a. en condiciones basales y tras la administración de isoproterenol, respectivamente). En las Figs. 30B y 30C se representan la evolución del índice de colocalización de ambas señales a lo largo del tiempo y los valores totales de colocalización en condiciones basales y tras la administración de insulina, respectivamente. Las Figs. 30E y 30F representan los mismos parámetros antes y después de la estimulación lipolítica.

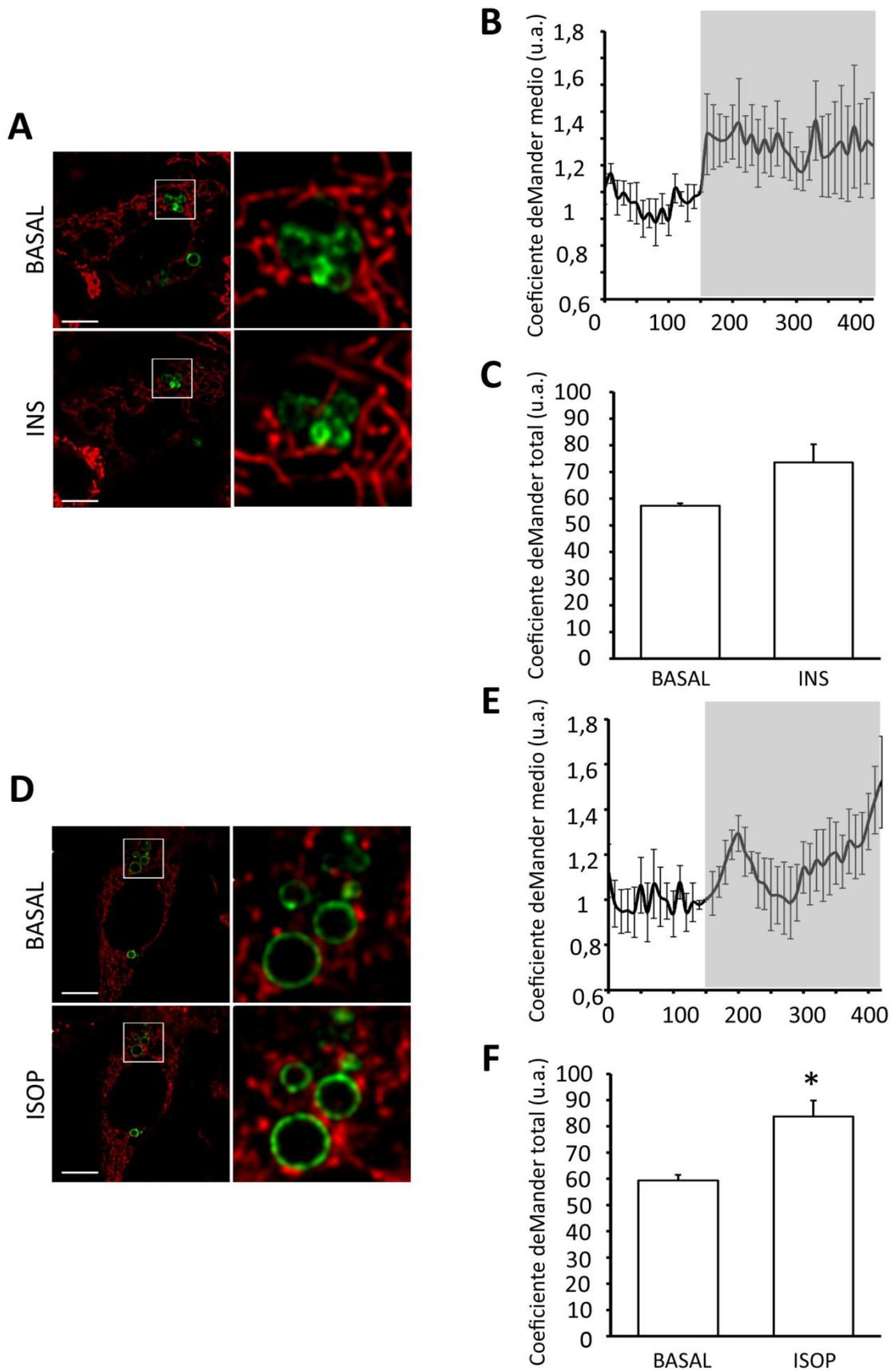


Figura 30. Videomicroscopía en tiempo real en adipocitos 3T3-L1 transfectados con GFP-Rab18 y teñidos con el marcador vital de mitocondrias *Mitotracker* monitorizados bajo condiciones

basales y tras estimulación con insulina (100nM) o isoproterenol (10 μ M). Imágenes representativas de adipocitos antes y después de la administración lipogénica (A) o lipolítica (D). Barra de escala, 5 μ m. Representación gráfica de la variación del valor medio del coeficiente de Mander en las LDs normalizado al punto de inyección del tratamiento con respecto al tiempo en condiciones de estimulación lipogénica (B) y lipolítica (E), (C) y (F) Representan el valor medio del área bajo la curva de los coeficientes de Mander antes y después del tratamiento con insulina o isoproterenol, respectivamente.

Para extender el marco temporal del estudio, los adipocitos 3T3-L1 fueron tratados durante 2 ó 4 h con insulina (100 nM) o isoproterenol (10 μ M), teñidos con el marcador vital *Mitotracker* durante los últimos 45 min de tratamiento y, posteriormente, inmunomarcados con el anticuerpo anti-Rab18. En la Fig. 31A se muestran imágenes representativas de microscopía confocal de adipocitos 3T3-L1 con marcajes fluorescentes para Rab18 y mitocondrias en ausencia y presencia de insulina durante 2 y 4 h. La cuantificación de la colocalización de las señales mostró que, mientras que la exposición de las células a insulina durante 2 h no alteró la distribución intracelular de estos orgánulos, el tratamiento prolongado (4 h) provocó un incremento significativo del grado de colocalización entre Rab18-LDs y mitocondrias (Fig. 31B).

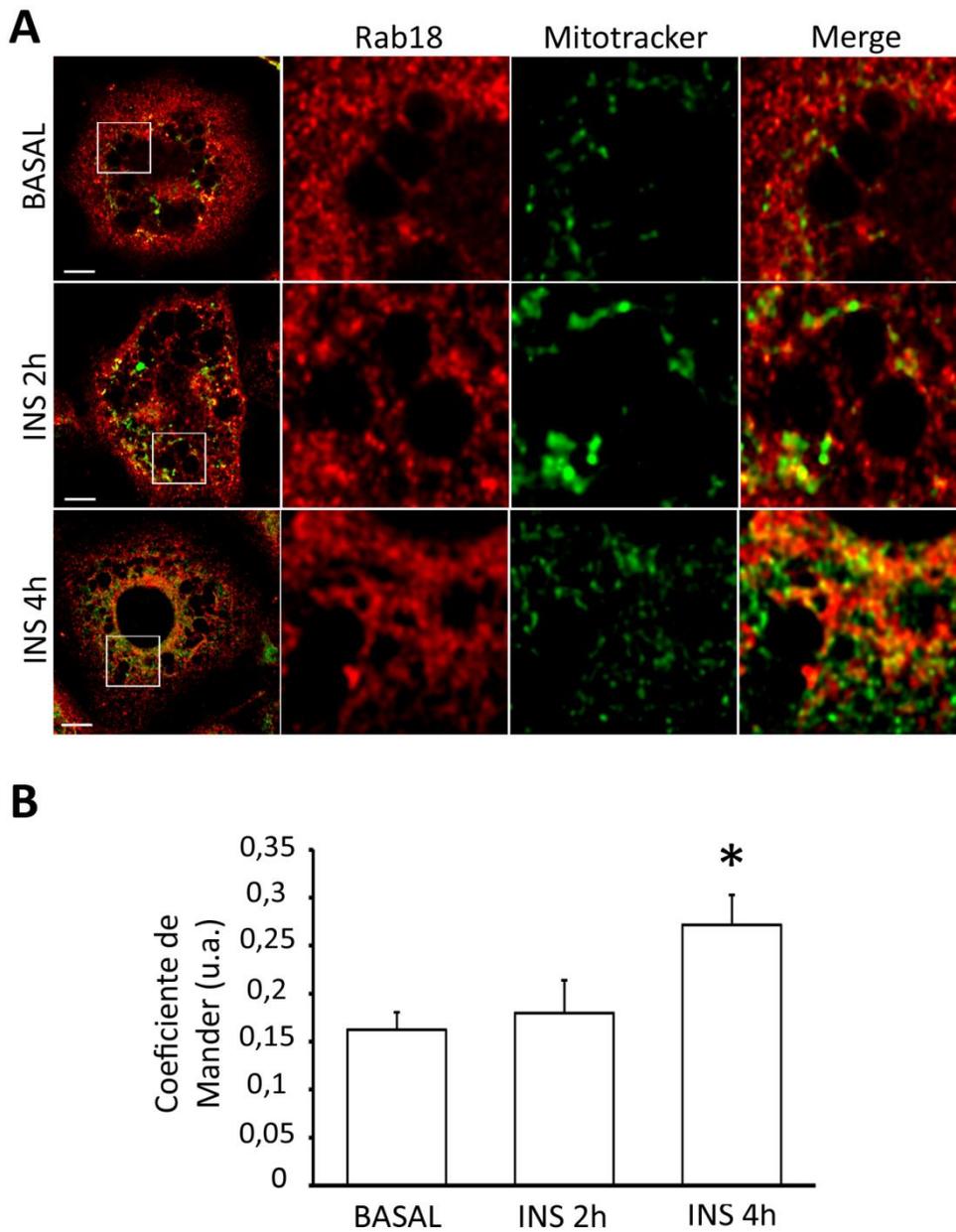


Figura 31. Estudio de colocalización de Rab18 con el marcador vital de mitocondrias *Mitotracker* en adipocitos 3T3-L1. (A) Imágenes representativas de microscopía confocal de células 3T3-L1 sometidas a tratamientos de 2 ó 4 h con Insulina (100 nM), marcadas *in vivo* con el marcador *Mitotracker* (verde) y procesadas para inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-Rab18 (rojo). Barra de escala, 5 μ m. (B) Coeficiente de colocalización medio que muestran ambas señales fluorescentes. *, $P < 0,01$ vs. condiciones basales.

Con respecto al isoproterenol, tanto el tratamiento de 2 h como el de 4 h provocaron efectos similares sobre la redistribución de Rab18-LDs y mitocondrias. En ambos casos, el índice de colocalización medio aumentó alrededor del 50% a las 2 h y tras 4 h de estimulación (Figs. 32A y 32B).

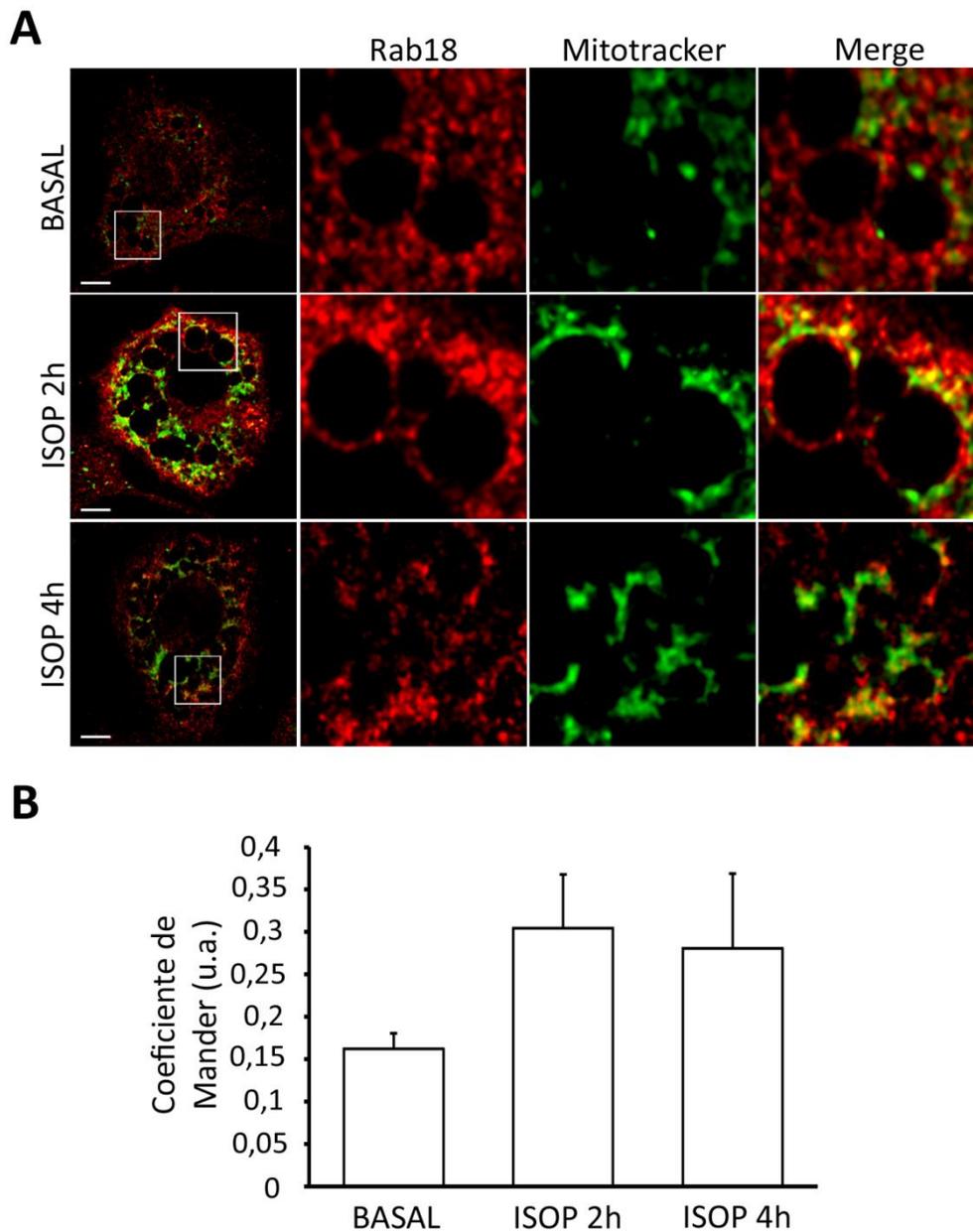


Figura 32. Estudio de colocalización de Rab18 con el marcador vital de mitocondrias *Mitotracker* en adipocitos 3T3-L1. (A) Imágenes representativas de microscopía confocal sobre células 3T3-L1 sometidas a tratamientos de 2 ó 4 h con isoproterenol (10 μ M), marcadas *in vivo* con el marcador *Mitotracker* (verde) y procesadas para inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-Rab18 (rojo). Barra de escala, 5 μ m. (B) Coeficiente de colocalización medio que muestran ambas señales fluorescentes.

Sin embargo, encontramos un grado de variabilidad relativamente considerable entre la población de gotas analizadas (al menos 30 por grupo experimental), lo que resultó en la falta de diferencias estadísticamente significativas. Esta variabilidad entre las distintas gotas en respuesta a isoproterenol nos llevó a investigar si pudieran existir distintas subpoblaciones de LDs con diferente capacidad para asociarse con

mitocondrias. Para explorar esta posibilidad, analizamos en primer lugar la relación existente entre el tamaño de las gotas con respecto a su capacidad de interacción con mitocondrias. En la Fig. 33A se representan las distribuciones correspondientes a la colocación de mitocondrias y Rab18 en la superficie de las LDs, indicando en cada caso el área media de las gotas en cada intervalo. Este tipo de análisis reveló que aproximadamente el 40% de las Rab18-LDs no mostró asociación con mitocondrias en ausencia de estímulos. Algo similar fue observado tras la estimulación con insulina durante 2 h. Aproximadamente, el 35% del total de Rab18-LDs carecían de mitocondrias. Sin embargo, el tratamiento de 4 h con insulina incrementó fuertemente la asociación de mitocondrias a las gotas, de manera que un 80% de las Rab18-LDs presentaron asociación con mitocondrias. A pesar de estos cambios en la relación gotas/mitocondrias inducida por insulina, este efecto parece ser independiente del tamaño de las LDs, puesto que en ninguno de los casos analizados apareció una correlación clara entre las dos variables (Fig. 33B).

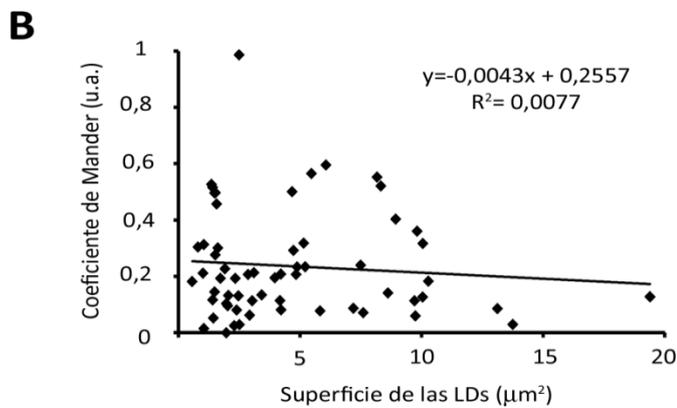
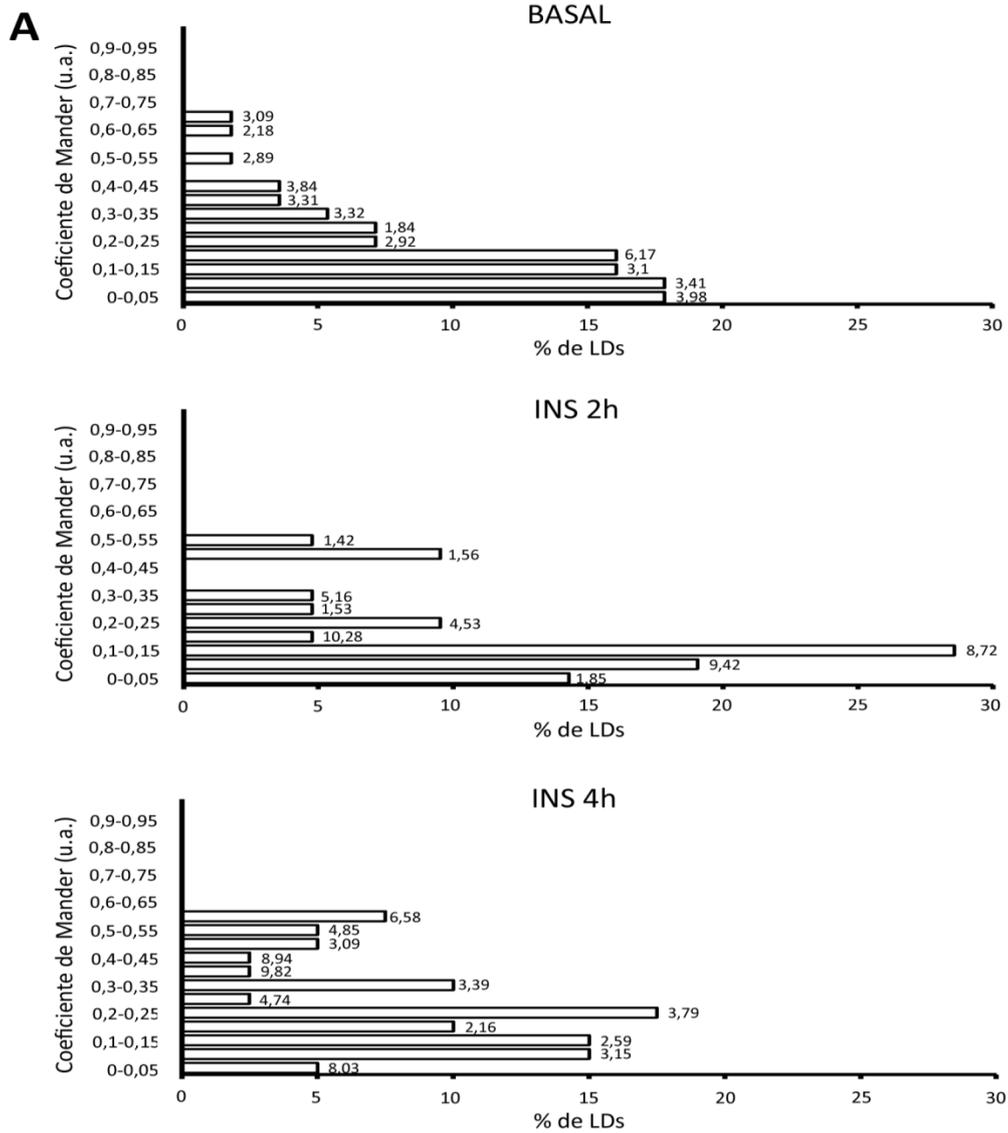


Figura 33. Efecto de la insulina sobre la distribución de Rab18-LDs y mitocondrias en adipocitos 3T3-L1. (A) Se cuantificó el porcentaje de LDs dentro de cada intervalo de coeficiente de colocalización entre Rab18-LDs y *Mitotracker* y se calculó el área media de cada uno de estos grupos (representada al final de las barras) en condiciones basales y tras estimulación con insulina (100 nM) durante 2 ó 4 h. (B) Gráfico de correlación entre los coeficientes de colocalización de Rab18-LDs con *Mitotracker* y la superficie de las LDs.

Por otra parte, el tratamiento de los adipocitos con isoproterenol provocó un cambio claro en la distribución de las LDs con respecto a condiciones basales (Fig. 34A). Así, aproximadamente el 35% de las Rab18-LDs no presentó coincidencia espacial con mitocondrias en las condiciones analizadas, sin embargo, el 65% restante exhibió una mayor respuesta al estímulo lipolítico en cuanto a su relación con mitocondrias. De este 65%, más del 20% mostró un índice de colocalización con mitocondrias elevado en adipocitos 3T3-L1 tratados con isoproterenol durante 2 h ó 4 h (Fig. 34A). Además, el análisis de correlación del índice de colocalización y el tamaño de las gotas reveló que las mitocondrias tienden a asociarse a las Rab18-LDs de menor tamaño ($< 2 \mu\text{m}^2$; Fig. 34B).

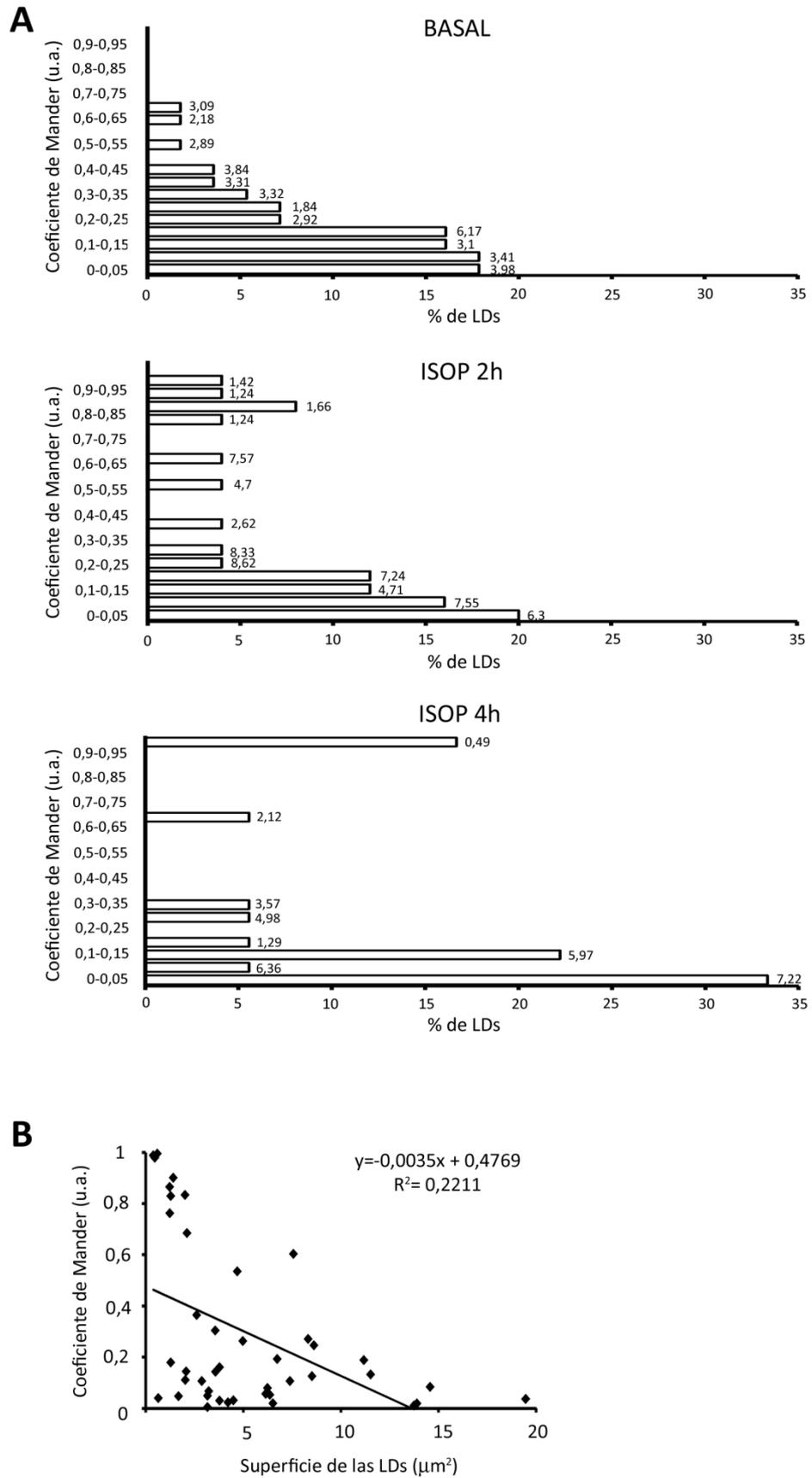


Figura 34. Efecto del isoproterenol sobre la distribución de colocalización de Rab18-LDs y mitocondrias en adipocitos 3T3-L1. (A) Se cuantificó el porcentaje de LDs dentro de cada

intervalo de coeficiente de colocalización entre Rab18-LDs y *Mitotracker* y se calculó el área media de cada uno de estos grupos (representada al final de las barras) en condiciones basales y tras estimulación con isoproterenol (10 μ M) durante 2 ó 4 h. (B) Gráfico de correlación entre los coeficientes de colocalización Rab18-LDs con *Mitotracker* y la superficie de las LDs.

El conjunto de estos resultados indica que existe una relación espacial entre las Rab18-LDs y las mitocondrias tras estímulos lipolíticos que depende directamente del tamaño de las LDs.

4.4.3. Peroxisomas

En este estudio, también llevamos a cabo el seguimiento de la movilización de los peroxisomas en relación a las Rab18-LDs en respuesta a estímulos lipogénicos y lipolíticos mediante videomicroscopía. Para ello, los adipocitos fueron co-electroporados con DsRed-Rab18 y un vector de expresión que codifica el péptido señal de transporte a peroxisomas (SKL) fusionado a GFP. Las Figs. 35A y 35D así como los vídeos 4 y 5 incluidos en la Información Suplementaria, muestran adipocitos 3T3-L1 co-electroporados con DsRed-Rab18 y GFP-SKL antes y después del tratamiento con insulina (100 nM) e isoproterenol (10 μ M). El análisis de colocalización entre las dos señales reveló que, bajo condiciones basales, existe un cierto grado de colocalización entre Rab18-LDs y peroxisomas. Además, la exposición a ambos tratamientos provocó un acercamiento de los peroxisomas a las LDs marcadas con DsRed-Rab18 en un periodo de tiempo muy corto (5 min), lo que se vio reflejado en un incremento significativo en el grado de colocalización entre las gotas con Rab18 y los peroxisomas. Concretamente, del 46% al 54% de las LDs con Rab18 en su superficie mostraron un aumento de colocalización con peroxisomas tras la estimulación con insulina e isoproterenol, respectivamente. La evolución del índice de colocalización de ambas señales a lo largo del tiempo y los valores totales de colocalización en condiciones basales y tras la administración del estímulo, se representan en las Figs. 35B y 35C en el caso de tratamientos con insulina, y Figs. 35E y 35F en tratamientos con isoproterenol. En conjunto, estos resultados mostraron que tanto la estimulación lipogénica como lipolítica inducen una asociación de las Rab18-LDs y peroxisomas en un marco temporal de minutos.

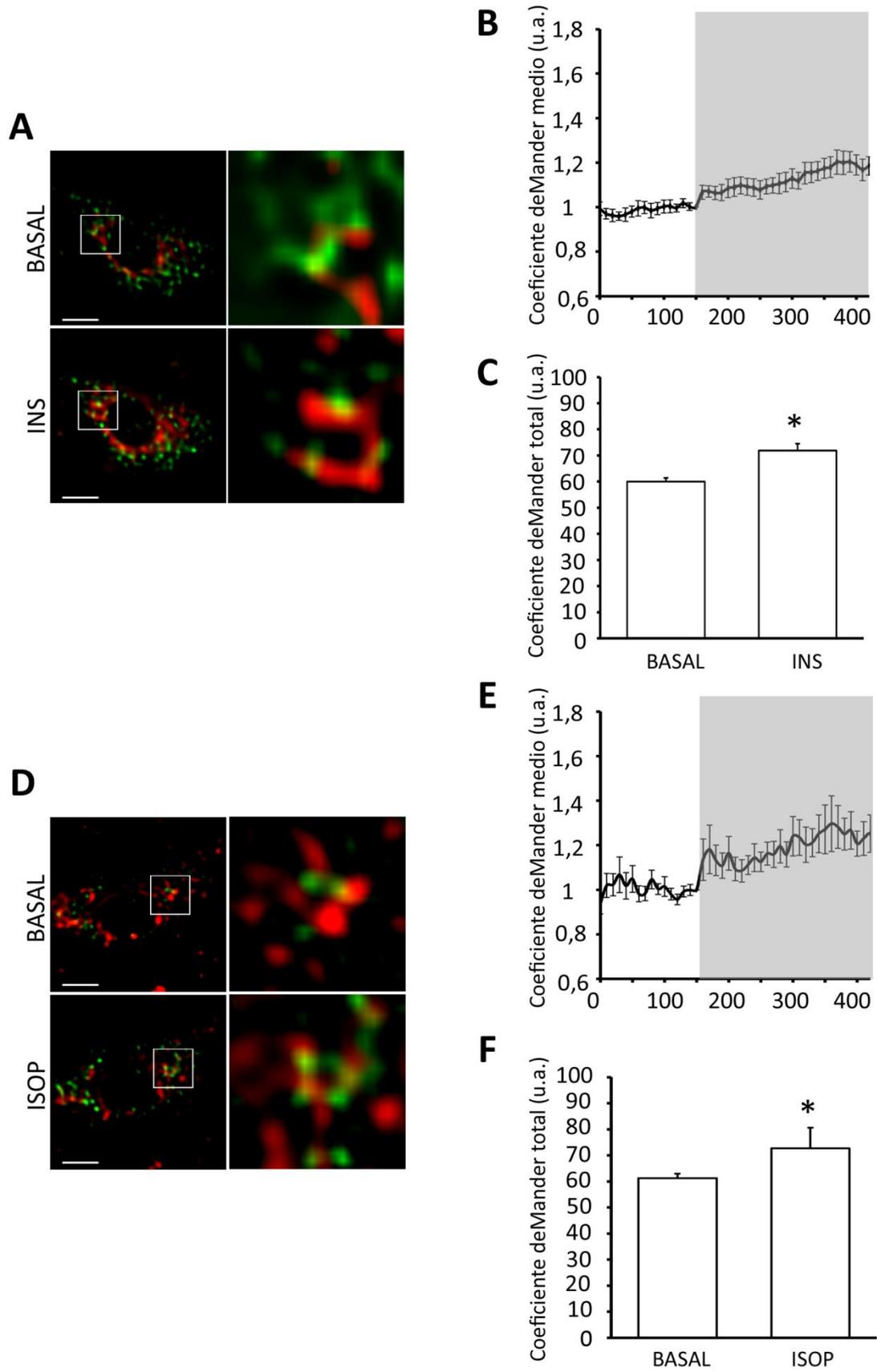


Figura 35. Videomicroscopía en tiempo real de adipocitos 3T3-L1 co-transfectados con DsRed-Rab18 y GFP-SKL y monitorizados bajo condiciones basales y tras estimulación con insulina

(100nM) o isoproterenol (10 μ M). Imágenes representativas de adipocitos antes y después de la administración lipogénica (A) o lipolítica (D). Barra de escala, 5 μ m. Representación gráfica de la variación del valor medio del coeficiente de Manders en las LDs normalizado al punto de inyección del tratamiento con respecto al tiempo en condiciones de estimulación lipogénica (B) y lipolítica (E). (C) y (F) Representan el valor medio del área bajo la curva de los coeficientes de Manders antes y después del tratamiento con insulina e isoproterenol, respectivamente.

Igualmente, analizamos el efecto a más largo plazo (2 h y 4 h) de insulina e isoproterenol sobre la relación espacial de peroxisomas y Rab18-LDs mediante doble inmunofluorescencia frente a Rab18 y el marcador de peroxisomas PMP70. Para ello, se analizaron aquellas LDs que presentaban Rab18 asociado a su superficie con el fin de determinar el grado de colocalización entre Rab18 y PMP70 en ausencia o presencia del tratamiento. Como puede observarse en las imágenes de microscopía confocal mostradas en la Fig. 36A, el tratamiento con insulina provocó un fuerte aumento del número de peroxisomas alrededor de las Rab18-LDs, lo que fue confirmado mediante cuantificación de los valores medios del índice de colocalización entre Rab18-LDs y PMP70 en ausencia o presencia del factor lipogénico (Fig. 36B).

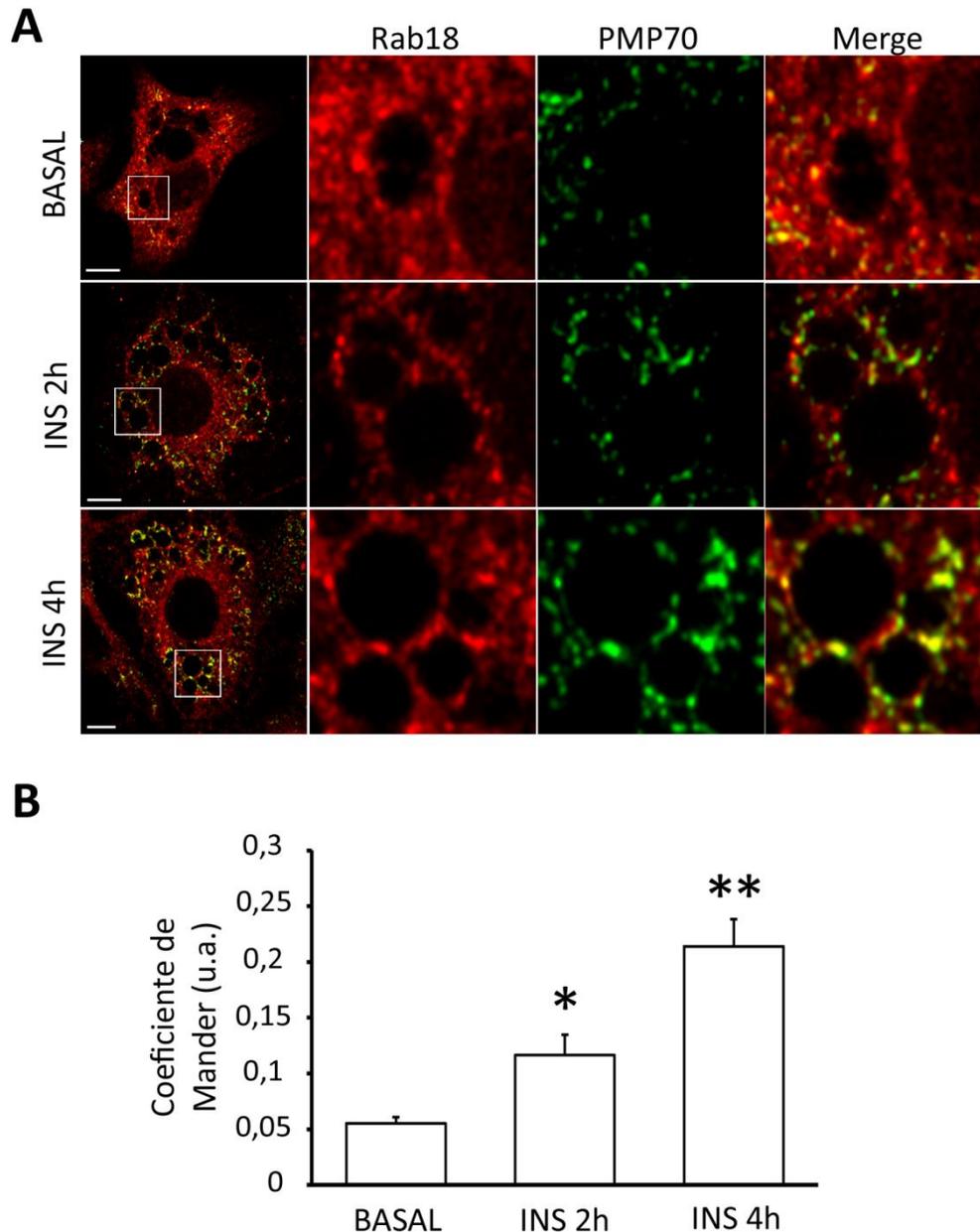


Figura 36. Estudio de colocalización de Rab18 con el marcador de peroxisomas PMP70 en adipocitos 3T3-L1. (A) Imágenes representativas de microscopía confocal de células 3T3-L1 sometidas a tratamientos de 2 ó 4 h con Insulina (100 nM) y procesadas para doble inmunofluorescencia con los anticuerpos anti-Rab18 (rojo) y anti-PMP70 (verde). Barra de escala, 5 μ m. (B) Coeficiente de colocalización medio que muestran ambas señales fluorescentes. *, $P < 0,01$ vs. condiciones basales. **, $P < 0,001$ vs. condiciones basales.

Con respecto a la vía lipolítica, el tratamiento con isoproterenol también aumentó el número de peroxisomas alrededor de las Rab18-LDs, aunque, como se puede observar en las imágenes de microscopía confocal de la Fig. 37A y atendiendo a la cuantificación del solapamiento de señales fluorescentes mostrado en la Fig.37B, este efecto fue menos importante desde el punto de vista cuantitativo que en el caso de la estimulación lipogénica.

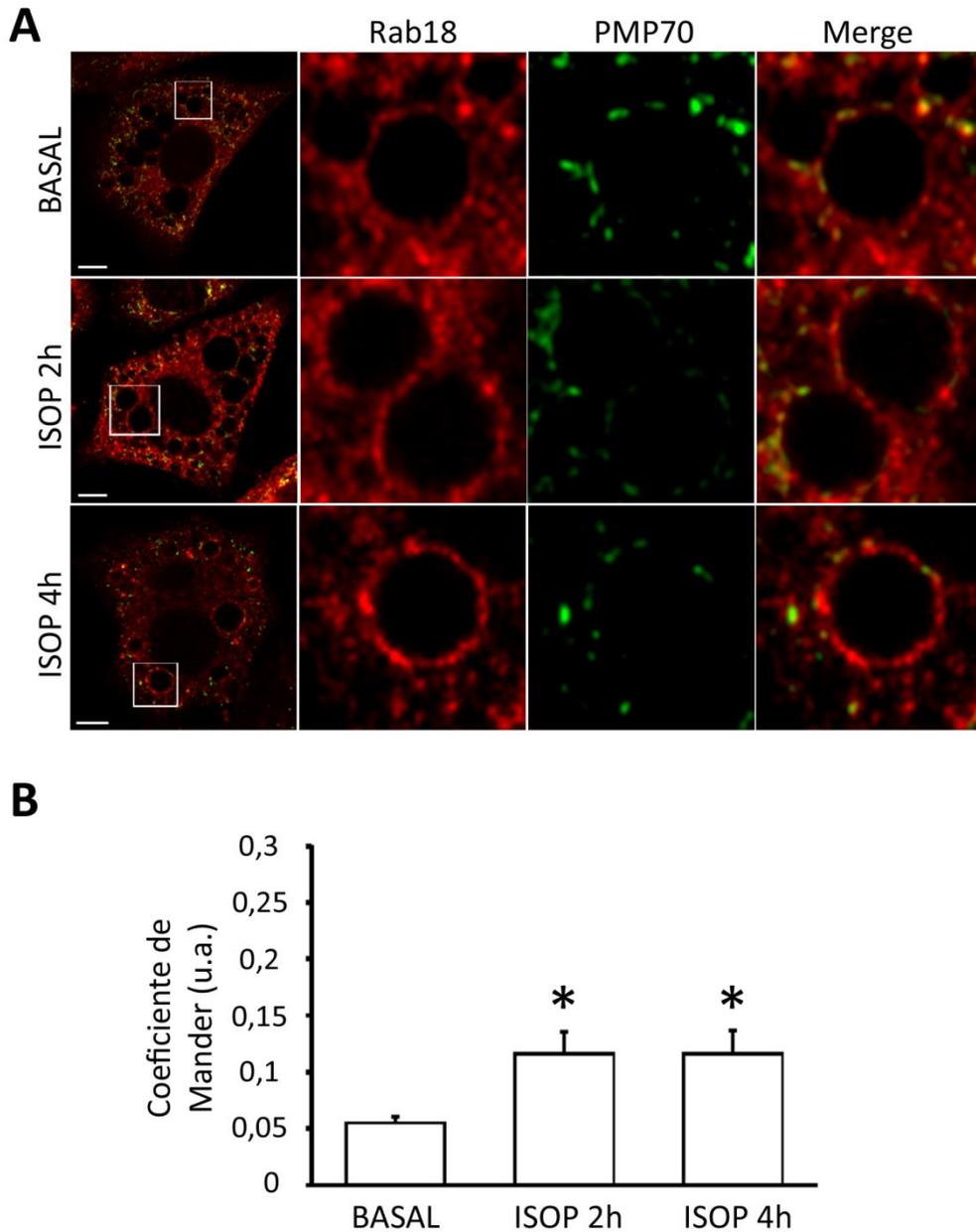


Figura 37. Estudio de colocalización de Rab18 con el marcador de peroxisomas PMP70 en adipocitos 3T3-L1. (A) Imágenes representativas de microscopía confocal de células 3T3-L1 sometidas a tratamientos de 2 ó 4 h con Isoproterenol (10 μ M) y procesadas para doble inmunofluorescencia con los anticuerpos anti-Rab18 (rojo) y anti-PMP70 (verde). Barra de escala, 5 μ m. (B) Coeficiente de colocalización medio que muestran ambas señales fluorescentes. *, $P < 0,01$ vs. condiciones basales.

Para evaluar si el acercamiento de peroxisomas a las Rab18-LDs es dependiente del tamaño de éstas, se llevaron a cabo distribuciones de frecuencias de las gotas con respecto a su índice de colocalización con peroxisomas y se calculó el área media de las gotas representadas en cada intervalo (Fig. 38A). Así, en condiciones basales alrededor del 20% de las Rab18-LDs presentaron colocalización con peroxisomas. El tratamiento con insulina durante 2 h provocó un aumento significativo del porcentaje de gotas

asociadas a peroxisomas, que alcanzó el 55% de la población total. Este efecto fue más evidente en el tratamiento de 4 h con insulina, tras el cual hasta el 80% del total de Rab18-LDs presentaron asociación con peroxisomas (Fig. 38A). Por otra parte, el análisis de correlación de la presencia de peroxisomas alrededor de las gotas y el tamaño de éstas no mostró una relación significativa entre ambas variables, lo que sugiere que los peroxisomas se acercan a la población total de Rab18-LDs independientemente de su tamaño en respuesta a estímulos lipogénicos (Fig. 38B).

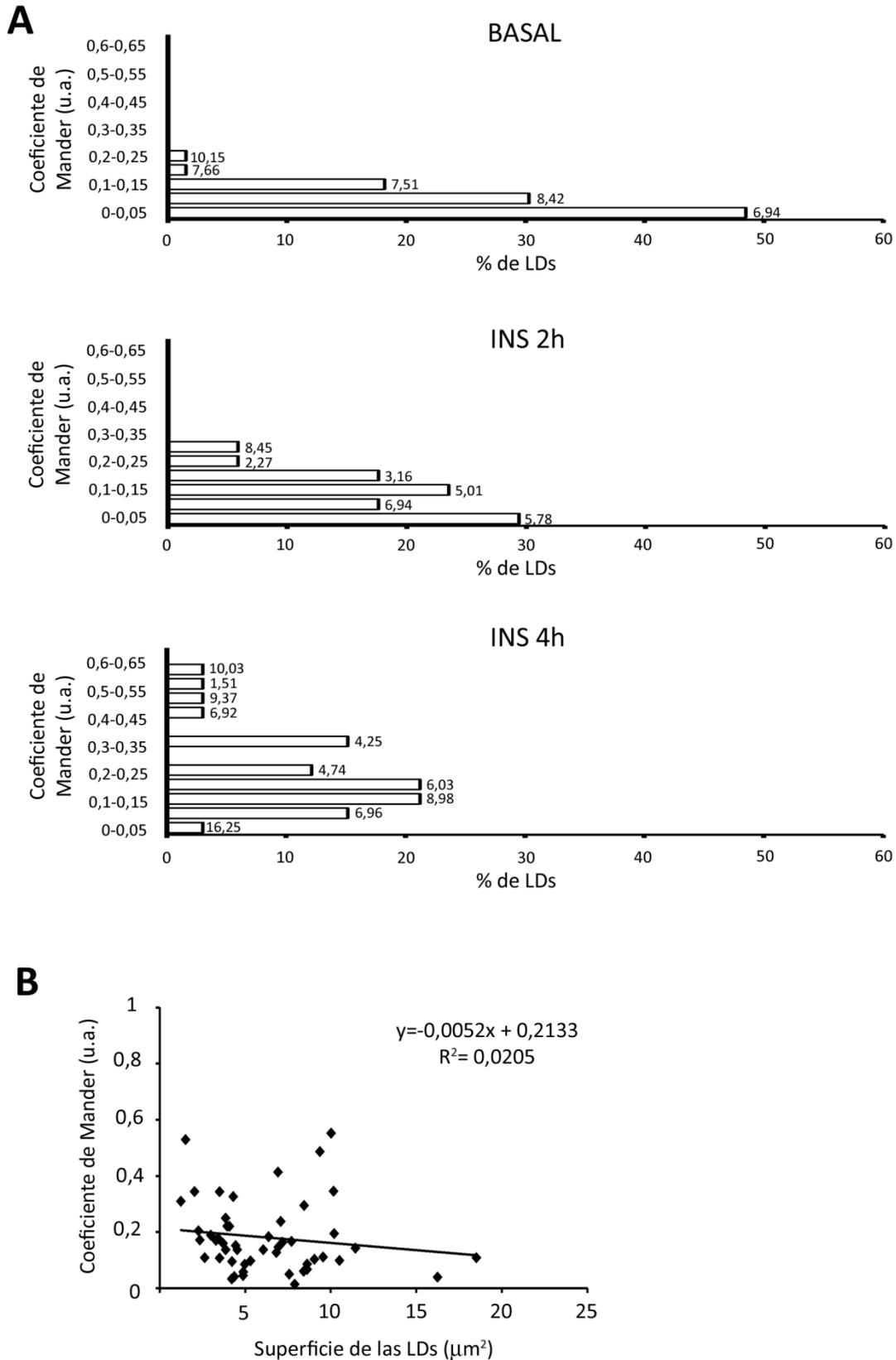


Figura 38. Efecto de la insulina en la distribución de colocalización de Rab18-LDs y peroxisomas en adipocitos 3T3-L1. (A) Se cuantificó el porcentaje de LDs dentro de cada intervalo de coeficiente de colocalización entre Rab18-LDs y el marcador de peroxisomas PMP70 y se calculó el área media de cada uno de estos grupos (representada al final de las barras) en

condiciones basales y tras estimulación con insulina (100 nM) durante 2 ó 4 h. (B) Gráfico de correlación entre los coeficientes de colocalización Rab18-LDs con PMP70 y la superficie de las LDs.

La estimulación lipolítica también modificó la distribución de frecuencias, aunque de forma menos pronunciada que en respuesta a la activación de la lipogénesis. En este caso, el tratamiento de las células con isoproterenol durante 2 h y 4 h, promovió el acercamiento de peroxisomas a las Rab18-LDs que incrementó desde un 20% de Rab18-LDs asociadas a peroxisomas en condiciones basales a un 50% que se mantuvo a ambos tiempos de estimulación lipolítica. Por último, tampoco se encontró correspondencia alguna entre el tamaño de las gotas y la asociación de peroxisomas a éstas, como se puede observar en las gráficas de correlación (Fig. 39B).

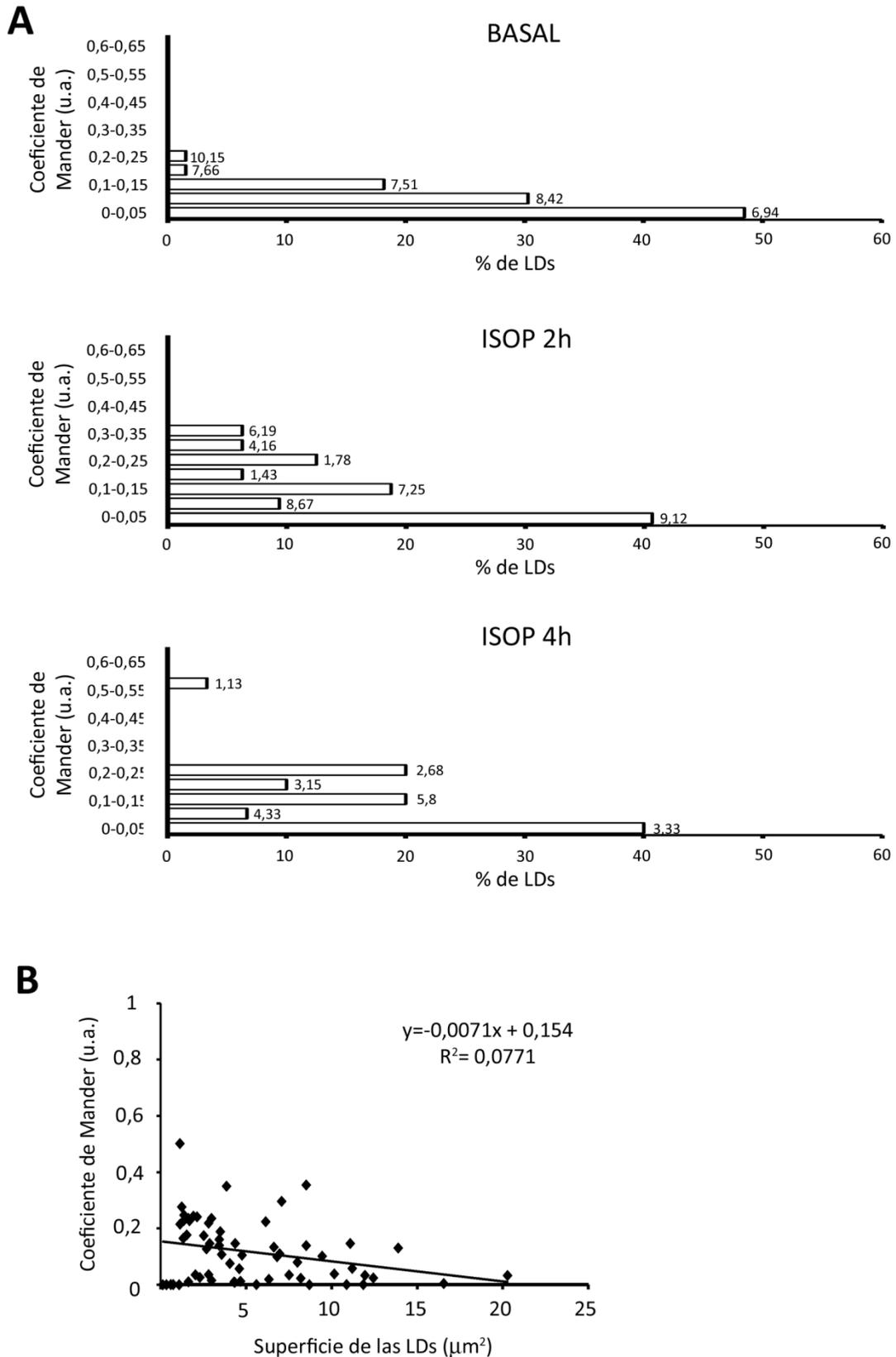


Figura 39. Efecto del isoproterenol en la distribución de colocación de Rab18-LDs y peroxisomas en adipocitos 3T3-L1. (A) Se cuantificó el porcentaje de LDs dentro de cada intervalo de coeficiente de colocación entre Rab18-LDs y el marcador de peroxisomas PMP70 y se calculó el área media de cada uno de estos grupos (representada al final de las

barras) en condiciones basales y tras estimulación con isoproterenol (10 μ M) durante 2 ó 4 h. (B) Gráfico de correlación entre los coeficientes de colocalización Rab18-LDs con PMP70 y la superficie de las LDs.

4.4.3.1. Repercusión funcional de la interacción entre Rab18-LDs y peroxisomas

En vista de la coincidencia espacial existente entre las Rab18-LDs y los peroxisomas sobre todo inducida por insulina, nos planteamos analizar si Rab18 podría ejercer algún papel regulador de la actividad de los peroxisomas. En este sentido, la actividad enzimática que mejor define el metabolismo de los peroxisomas es la catalasa, la cual está involucrada en la degradación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) generado por las oxidasas peroxisomales (revisado en Wanders y Waterham 2006). En particular, el O_2 es el aceptor en la primera reacción de β -oxidación de ácidos grasos de cadena muy larga, dando lugar a H_2O_2 , que es eliminado por la catalasa. De esta forma, se evaluó la actividad catalasa en adipocitos 3T3-L1 electroporados con cMyc-Rab18 o el vector vacío (células *mock*) analizando el consumo de H_2O_2 en los extractos celulares. Como se muestra en la Fig. 40A, las células que sobreexpresaban Rab18 mostraron niveles de actividad catalasa 2,5 veces mayores que las células control. Sobre la base de estas observaciones y puesto que los peroxisomas están involucrados tanto en la generación como en la eliminación de ROS (revisado en Schrader y Fahimi, 2006), analizamos también la abundancia de ROS en adipocitos que sobreexpresan Rab18. Para ello, se electroporaron adipocitos 3T3-L1 con el vector cMyc-Rab18 o con el vector vacío (*mock*) y se analizó la presencia de ROS en estos cultivos con diclorofluoresceína diacetato (H_2DCFDA ; ver Material y Métodos). Como se puede observar en la Fig. 40B, la sobreexpresión de Rab18 provocó una disminución del 60% en los niveles de ROS intracelulares.

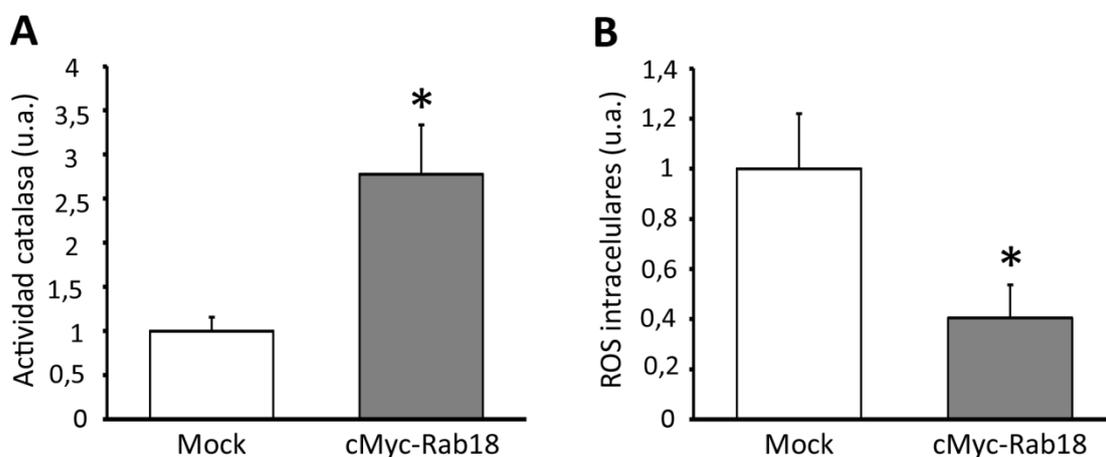


Figura 40. Ensayos de cuantificación de actividad catalasa y ROS en adipocitos 3T3-L1. (A) Se

determinó la actividad catalasa de adipocitos 3T3-L1 electroporados con cMyc-Rab18 o el vector vacío (*mock*). Se representan los valores de actividad referidos al control. (B) Se representan los valores de ROS como ratio de la intensidad de fluorescencia referidos al control. *, $P < 0,05$ vs. *mock*. (n= 4 experimentos independientes).

4.5. Mecanismos moleculares de acción de Rab18. Identificación y caracterización del interactoma de Rab18

En general, las proteínas Rab actúan como interruptores moleculares que ciclan entre dos estados según se encuentren unidas a GDP o GTP. La modulación de su actividad por el intercambio de nucleótidos requiere de proteínas reguladoras que estabilizan a las Rab tanto en su estado inactivo en el que se encuentran unidas a GDP como el activo tras su asociación a GTP. Una vez activadas, interactúan con distintas proteínas (efectores) que son las responsables últimas de traducir la información contenida en la GTPasa en una respuesta determinada del compartimento al que se asocia (revisado en Pfeffer, 2013). Por tanto, para entender mejor cómo afecta la presencia de Rab18 en la superficie de las LDs a su dinámica intracelular llevamos a cabo una estrategia múltiple para identificar interactores de esta GTPasa en adipocitos, lo que incluyó estudios proteómicos de la cubierta de las LDs, inmunoprecipitación y ensayos de doble híbrido de levaduras (*Yeast Two-Hybrid screening*; Y2H).

4.5.1. Proteómica de LDs

Estudios proteómicos previos han mostrado que la composición proteica de las LDs de adipocitos 3T3-L1 sufre una redistribución considerable en respuesta a una estimulación lipolítica (Brasaemle *et al.*, 2004). En este estudio, hemos ampliado estas observaciones analizando la reorganización estructural de la cubierta de las LDs en respuesta a estímulos lipogénicos. Para ello, se llevó a cabo el aislamiento de LDs mediante subfraccionamiento celular en gradientes de sacarosa a partir de adipocitos 3T3-L1 no tratados y expuestos a insulina durante 4 h. En la Fig. 41 se muestra un inmunoblot de las distintas fracciones del gradiente, en el que se puede observar el enriquecimiento de las fracciones más ligeras (1 y 2) en el marcador de LDs, PLIN y el enriquecimiento de las fracciones más pesadas (8 y 9) en el marcador de membranas calnexina. El tratamiento con insulina no indujo un cambio significativo en la distribución de estos marcadores a lo largo del gradiente. Sin embargo, la insulina sí promovió un aumento de la cantidad de inmunoseñal para Rab18 tanto en las

fracciones enriquecidas en LDs como en las enriquecidas en membranas intracelulares, lo que está de acuerdo con los estudios de microscopía incluidos en apartados anteriores.

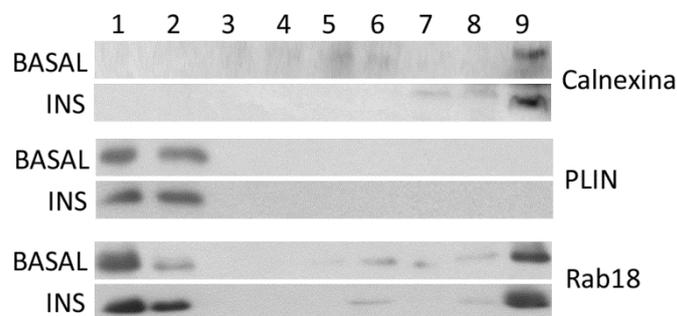


Figura 41. Fraccionamiento subcelular de adipocitos 3T3-L1 en condiciones basales o tras estimulación con insulina (100 nM) durante 4 h. La validación del fraccionamiento se llevó a cabo utilizando PLIN como marcador de las LDs, que se separan en las fracciones más ligeras, y calnexina, marcador del RE que se separa, junto a otras membranas celulares, en las fracciones más densas.

Tras confirmar la validez del fraccionamiento, los extractos proteicos correspondientes a las fracciones 1 y 2 fueron tripsinizados y procesados para cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y espectrometría de masas (trampa iónica). Los resultados de la identificación se muestran en la Tabla S1 (suplementaria). El análisis proteómico permitió la identificación de un total de 168 proteínas en las LDs de células en condiciones basales y 230 en las gotas de células estimuladas con insulina. De todas estas proteínas, 71 (marcadas en la Tabla 6 en negrita) ya habían sido identificadas en estudios proteómicos previos de LDs aisladas de adipocitos (Brasaemle *et al.*, 2004; Ding *et al.*, 2012), células epiteliales (Liu *et al.*, 2004; Bartz *et al.*, 2007) y hepatocitos (Turró *et al.*, 2006). Las proteínas identificadas se clasificaron en 9 grupos mayoritarios atendiendo a su función o localización: miembros de la familia PAT, metabolismo lipídico, tráfico de membranas, citoesqueleto, RE, chaperonas, proteasoma, mitocondrias y señalización celular. Como se muestra en la Tabla 6, la mayor parte de las proteínas identificadas se incluyen en los grupos correspondientes a tráfico de membranas (i.e. anexinas, proteínas de membrana asociadas a vesículas o miembros de la familia de las Rab GTPasas y reguladores de su actividad) y de organización de citoesqueleto (i.e. tubulina, vimentina y dineína), lo que apoya la naturaleza dinámica de estos orgánulos. Además, el tratamiento de los adipocitos con insulina promovió la reorganización de la cubierta proteica de las LDs. Concretamente, apareció un mayor número de proteínas involucradas en el transporte

de ácidos grasos (i.e. FABP4 y FABP5; Cabré *et al.*, 2007; Glatz *et al.*, 1995), así como proteínas relacionadas con el tráfico intracelular de membranas y la reorganización del citoesqueleto (i.e. ARF1, ARHGAP, GDI2, actina, tubulina, filamina, etc; Jackson, 2014; Chini *et al.*, 1998; Bellot *et al.*, 2014). Cabe destacar el fuerte aumento en la presencia de proteínas relacionadas con la maquinaria de control de calidad de las proteínas (i.e. varias subunidades del proteasoma, como PSMD11, PSMA5, PSMC1, y proteínas de ubiquitinación como UBE2V1 y UBQLN1).

Tabla 6. Proteínas identificadas en el proteoma de LDs de adipocitos 3T3-L1. Se representan las proteínas que sólo aparecen en condiciones basales o tras estimulación lipogénica y aquéllas que son comunes para ambas condiciones.

	SÓLO BASAL	SÓLO INSULINA	COMUNES
FAMILIA PAT	S3-12		PLIN
			ADRP
			TIP47
METABOLISMO LIPÍDICO	ABHD5 (CGI-58)	AKR1A1	G6PD
	DHRS1	FABP4	IDH1
	HSD17B11	FABP5	PGK1
	HSD17B12	ME1	TPI1
	LPL	MOGAT1	DHRS1
		PC	
		PEBP1	
TRÁFICO DE MEMBRANAS	COPB1	ARF1	ANXA1
	CPNE8	ARHGAP	ANXA2
	EEA1	CLTC	ANXA3
	RAB10	COPG	ANXA4
	RAB1A	GDI2	ANXA5
	RAB21	KALRN	ANXA6
	RAB33A	OLA1	ARHGDIA
	RAB5C	RAB2A	ARHGDIB
	VAPA	RAB34	PDCD6IP
		RANBP1	RAB18
		SYTL2	RAB31
			RAB7A
			RHOA
		VAT1	
CITOESQUELETO	ACTC1	ACTA1	ACTB
	ACTR1B	ACTR3	ACTN1
	ACTR3	DNAH17	FLNA
	TUBA1A	DSTN	GSN
	TUBB2C	DYNC1H1	MSN
		FLNB	MTPN
		FLNC	MYH9
		MYH1	PFN1

		MYL9	SEPT2
		PLEC	Tpm4
		PLS3	VIM
		S100A11	
		SPTAN1	
		TLN1	
		TTN	
		TUBA1B	
		TUBB	
		TWF1	
		VCL	
		WDR1	
CHAPERONAS	DNAJA1	CCT2	FAF2
	DNAJA4	CCT3	HSP90AB1
	HSPA4	CCT6A	HSPA5
	HSPA9	CCT7	HSPA8
	HSPD1	HSP90B1	SERPINH1
		PFDN5	
PROTEASOMA	AUP	PSMA2	PSMC3
	UBE2G2	PSMA5	UBA1
		PSMC1	
		PSMC4	
		PSMD11	
		PSMD12	
		PSMD3	
		UBE2V1	
		UBQLN1	
		USP14	
		USP4	
		ISG15	
SEÑALIZACIÓN CELULAR	GNG12	AHNAK2	S100A10
	MARCKS	PPP2R1A	SEMA4C
	NMI	PRKAR2B	STAT1
	YWHAB	PRKCSH	Ywhaq
	ADCY5	STAT3	YWHAZ
		YWHAE	
		YWHAG	
		CAMK1	
		CAPNS1	
		RICTOR	
		IQGAP1	
RE	CALU		CYB5R3
	ERP29		ERO1L
	PDIA6		P4HB
	PRDX2		PDIA3

			VCP
MITOCONDRIAS	ALDH2	SLC25A19	MDH2
	MDH1		
MISCELÁNEAS	AHNAK2	Adh6b	ALDOA
	BRSK2	AMOTL1	ATP6V1A
	C11orf58	ANKRD40	BASP1
	CAPN2	ASNS	CLIC1
	CARS	ATIC	Eef1a1
	CHMP6	ATOX1	EEF2
	CNPY2	ATP6V1E1	EIF5A
	Cyp2b13/Cyp2b9	C14orf49	Gstp1
	DARS	C6orf115	KPNB1
	DRD5	CAPRIN1	LDHA
	DTX3L	CHD4	LPP
	EG224916	CNBP	PAFAH1B1
	EIF4A2	CSRP1	PDLIM5
	EIF5A	CSTB	PGAM1
	FBXL18	CXorf49/CXorf49B	PKM2
	FGD5	CYLD	PNP
	GBP2	DBN1	PPIA
	GFPT1	DBNL	PRDX6
	GSTM5	DPYSL2	Prss3
	HMGB1L1	EEF1D	RNH1
	HNRNPH1	EIF2S1	Rpl12
	IFITM3	EIF3H	RPLP2
	Igtp	EIF5A	RPS5
	KLHL29	ESD	RRBP1
	KRT6A	FADD	SOD1
	LAMB3	FAM114A2	STIP1
	LDHA	FUBP1	TKT
	LGALS1	GARS	
	LOC100044627	Gm884	
	LOC100503183	GMFG	
	LOC676974	GON4L	
	MCM5	GPI	
	MID1	GSTO1	
	Naca	HINT1	
	NEDD8	HMGB2	
	OLR1	HNRNPA2B1	
	P4HA1	HNRNPF	
	PCBP3	IFIT3	
	PLA2G4A	IGFN1	
	PLOD1	KATNA1	

	RPL14	LAMA5	
	RPS4X	LDHA	
	RPS8	LGALS1	
	SERPINB6	LGALS3	
	SH3BGRL	LOC100048522	
	SYNE1	LOC100293160	
	TAGLN2	LOC100503793	
	TPD52L2	LOC100504791	
	USE1	LOC643751	
	UTP11L	LOC730144	
	YBX1	LOXHD1	
		MIF	
		MSH6	
		MTAP	
		NEDD4	
		NME2	
		NR1H3	
		NSFL1C	
		OTUB1	
		PAFAH1B2	
		PARK7	
		PCBP1	
		PLXNB2	
		PLXND1	
		PPP1CC	
		PRDX1	
		PREP	
		PTMS	
		RARS	
		RBM15	
		RPL23	
		SET	
		SLC7A14	
		TARS	
		THSD1	
		TPT1	
		TXN	
		UAP1L1	
		UTS2	
		VAX2	
		XDH	
		ZFP91	

Una de las proteínas identificadas como componente de la cubierta de las LDs en adipocitos tratados con insulina fue la proteína *Rab GDP dissociation inhibitor-2* (GDI2). Esta proteína, junto a GDI1 que es más abundante en células de sistema nervioso, están directamente relacionadas con la actividad de numerosas Rab GTPasas ya que, como se ha mencionado en la Introducción, interaccionan con éstas impidiendo el intercambio de GDP por GTP y, por tanto, manteniéndolo a las GTPasas en su estado inactivo (Pfeffer y Aivazian, 2004). Por ello, nos planteamos a continuación profundizar en la acción de GDI2 sobre la actividad de Rab18 y su relación con las LDs en particular y sobre el metabolismo lipídico en general. En primer lugar, analizamos la distribución intracelular de GDI2 mediante microscopía confocal y fraccionamiento subcelular combinado con *Western Blotting*. Así, observamos que GDI2 presentó una distribución citosólica en condiciones basales y que, el tratamiento con insulina indujo una redistribución de la inmunoseñal de GDI2, mostrándose ésta más concentrada en torno a las LDs (Fig. 42A). Por otra parte, los estudios de inmunoblot revelaron que esta proteína es esencialmente citosólica (Fig. 42B), por lo que su asociación a la superficie de las gotas no parece ser directa.

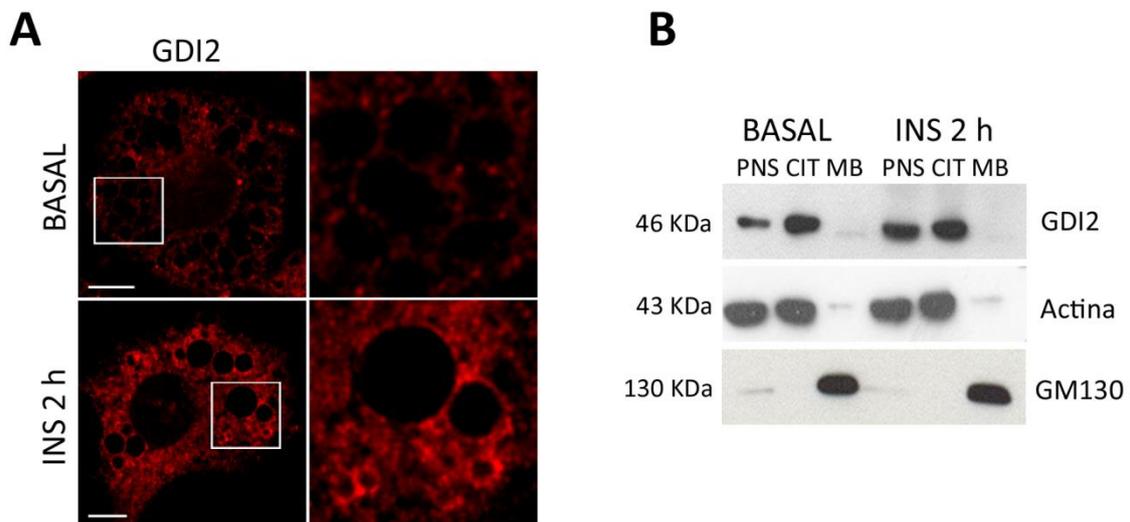


Figura 42. Análisis de la distribución subcelular de la proteína GDI2 en adipocitos 3T3-L1. (A) Imágenes representativas de microscopía confocal de células 3T3-L1 en condiciones basales (panel superior) y tras tratamiento con insulina (100 nM, 2 h) (panel inferior). Barra de escala, 5 μ m. (B) Fraccionamiento subcelular. El extracto post-nuclear (PNS) se centrifugó a 200.000 x g para separar la fracción cruda de membrana (MB) y la fracción citosólica (CIT). Se utilizaron actina y GM130 como controles internos del fraccionamiento.

A continuación, investigamos si variaciones en la cantidad de GDI2 en los adipocitos podrían afectar a la localización de Rab18 en torno a las LDs. Para ello, analizamos el grado de colocalización de Rab18 con PLIN en adipocitos 3T3-L1 que

sobreexpresaban DsRed-GDI2 y lo comparamos con el que mostraban células transfectadas con DsRed (células *mock*). Tal como se muestra en la Fig. 43A, y de manera similar a lo observado en los ensayos similares realizados en este estudio, la presencia de la proteína Rab18 endógena en la superficie de las LDs aumentó en respuesta a insulina en células *mock*. Sin embargo, en condiciones de sobreexpresión de GDI2, aunque Rab18 aumentó su asociación a las LDs en respuesta a insulina, este efecto resultó ser significativamente menor que el inducido en células *mock*, como se muestra en la Fig. 43B. Estos resultados sugieren que GDI2 previene la asociación de Rab18 a las LDs.

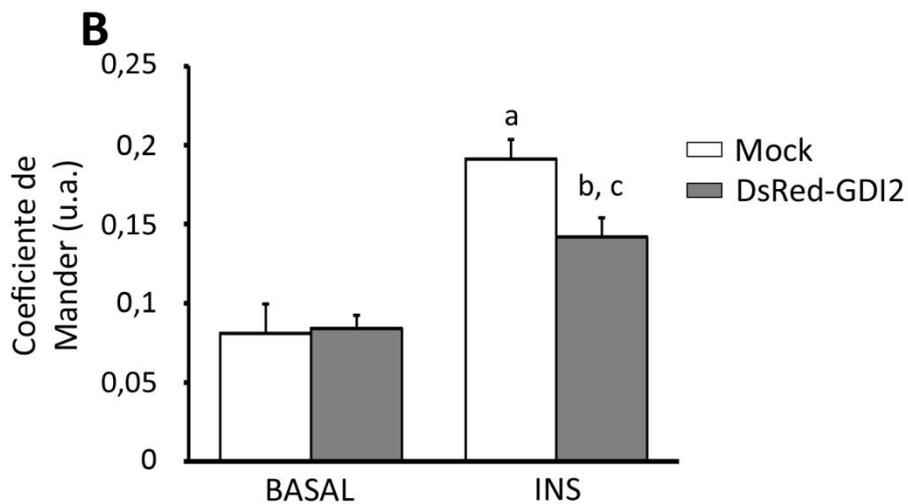
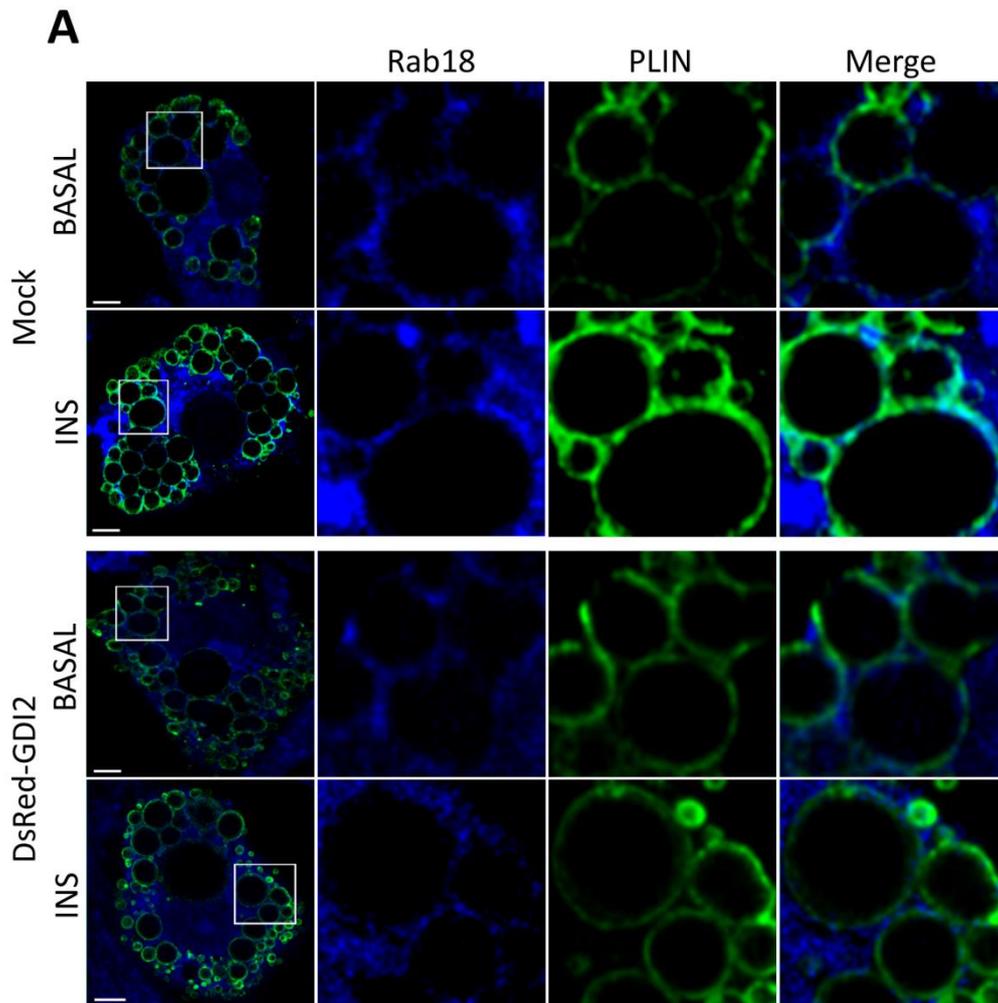


Figura 43. Efecto de la sobreexpresión de GDI2 en la asociación de Rab18 a las LDs. (A) Imágenes representativas de microscopía confocal de adipocitos 3T3-L1 electroporados con DsRed-GDI2 e inmunoteñidos frente a Rab18 (azul) y el marcador de gotas PLIN (verde). Barra de escala, 5 μ m. (B) Coeficiente de colocalización medio que muestran ambas señales fluorescentes. ^a, $P < 0,001$ vs. *mock* basal. ^b, $P < 0,001$ vs. DsRed-GDI2 basal, ^c, $P < 0,01$ vs. DsRed-GDI2 insulina (n= 4 experimentos independientes).

Puesto que en un estudio previo demostramos que Rab18 modula de forma positiva tanto la actividad lipogénica como la lipolítica de adipocitos 3T3-L1 (Pulido *et al.*, 2011), a continuación exploramos si GDI2 podría influir en el metabolismo lipídico de estas células. En concreto, para evaluar la función de GDI2 en la regulación de la lipogénesis, cuantificamos el contenido intracelular de TAGs en células que sobreexpresan DsRed-GDI2. Como muestra la Fig. 44A, la sobreexpresión de GDI2 provocó una disminución de un 28% en los niveles intracelulares de triglicéridos con respecto a los valores control. Por otra parte, también analizamos la implicación de esta proteína en la regulación de la lipólisis, para lo que se evaluó la cantidad de glicerol liberado al medio. En este sentido, la sobreexpresión de GDI2 redujo la liberación de glicerol al medio de cultivo, aunque este descenso no resultó estadísticamente significativo.

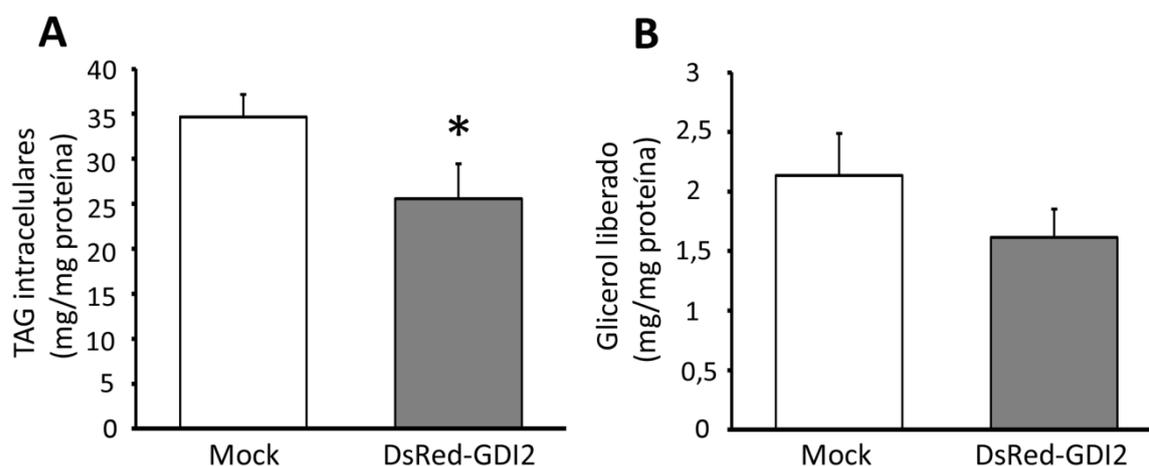


Figura 44. Efecto de la sobreexpresión de la proteína GDI2 en la actividad lipogénica y lipolítica de adipocitos 3T3-L1. Se evaluó (A) el contenido intracelular de triglicéridos (TAG) y (B) la cantidad de glicerol liberado al medio en adipocitos 3T3-L1 que sobreexpresaban un vector DsRed vacío (*mock*) o DsRed-GDI2. * $P < 0,05$ vs. *mock*.

4.5.2. Inmunoprecipitación

Los estudios proteómicos aportan una visión general de las proteínas que coexisten con Rab18 en la cubierta de las LDs, pero no ofrecen información sobre las proteínas que interactúan físicamente con la GTPasa. Con el fin de identificar estas proteínas, llevamos a cabo en primer lugar experimentos de inmunoprecipitación en extractos celulares de adipocitos 3T3-L1 electroporados con un vector de expresión que codifica cMyc-Rab18, y usando un anticuerpo anti-cMyc. En la Fig. 45 se muestra la comparación de los patrones de migración de las fracciones inmunoprecipitadas (IP)

de células electroporadas con el vector *mock* o con cMyc-Rab18. Así, detectamos la presencia de una banda de aproximadamente 145 KDa en extractos de células que sobreexpresan Myc-Rab18 que no estaba presente en los extractos de células transfectadas con el vector vacío. Mediante cromatografía líquida y MALDI-TOF/TOF identificamos esta proteína como la serina/treonina quinasa asociada a microtúbulos 3 (*microtubule associated serin/threonin kinase 3*; MAST3). Esta proteína pertenece a la familia de proteínas MAST, que comprende otros 5 miembros (MAST1-4 y MAST-like) y que se caracterizan por presentar en su estructura un dominio quinasa y un dominio PDZ (*postsynaptic density protein-95/discs large/zona occludens-1*) (Garland *et al.*, 2008).

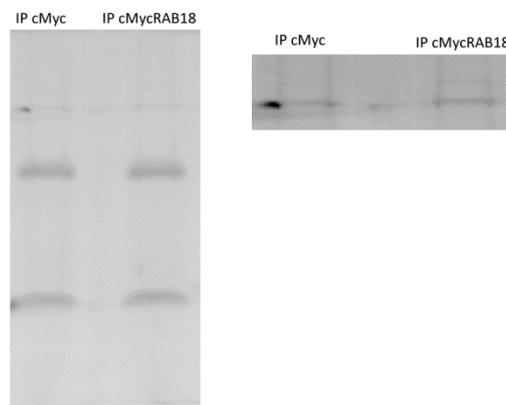


Figura 45: Ensayo de inmunoprecipitación para la identificación de posibles interactores de Rab18. Electroforesis de las fracciones IP de células transfectadas con el vector cMyc y con cMyc-Rab18 y posterior tinción del gel con Sypro. Se eligieron aquellas bandas que sólo aparecían en la fracción IP de células electroporadas para su identificación mediante cromatografía líquida y MALDI-TOF/TOF.

4.5.2.1. Estudios de colocalización de Rab18 y MAST3 en adipocitos

Analizamos en primer lugar la relación espacial de Rab18 y la proteína MAST3 mediante microscopía confocal. Para ello, llevamos a cabo la electroporación de adipocitos 3T3-L1 con el vector de expresión pRK5-HA-MAST3k que codifica el dominio quinasa de esta proteína (aminoácidos 366-581) y, tras 48 h, se realizó una doble inmunofluorescencia frente a HA y Rab18. Como se puede observar en la Fig. 46, MAST3 se distribuye de forma punteada en torno a las LDs donde, en muchas ocasiones, coincide con el marcaje de Rab18.

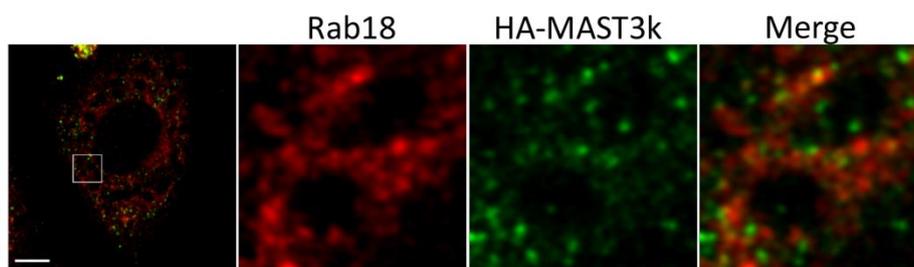


Figura 46. Distribución subcelular del dominio quinasa de MAST3 (HA-MAST3K) en adipocitos 3T3-L1. Imagen representativa de microscopía confocal de un adipocito 3T3-L1 electroporado con el vector pRK5-HA-MAST3K (verde) e inmunoteñido frente a Rab18 (rojo), donde se observa la colocalización de ambas señales fluorescentes en regiones cercanas a las LDs. Barra de escala, 5 μ m.

4.5.2.2. Análisis funcional de la interacción entre Rab18 y MAST3 en adipocitos

En estudios previos se ha demostrado que MAST3 modula la señalización mediada por insulina mediante la regulación de la ruta PI3K/Akt. Concretamente, MAST3 inhibe la fosfatasa PTEN que, cuando está activa, inhibe Akt provocando así la finalización de la señalización de insulina vía PI3K (Valiente *et al.*, 2005; Ikubo *et al.*, 2009; Rains y Jain, 2011; Matsuda *et al.*, 2013). Para investigar el significado funcional de la interacción de Rab18 con MAST3, analizamos el efecto de la sobreexpresión de Rab18 sobre la ruta de señalización de insulina evaluando la proporción de Akt fosforilada en relación a la proteína Akt total en respuesta a esta hormona. En la Fig. 47A se muestra un gel representativo de los niveles de Akt total y de fosforilación de Akt en condiciones de sobreexpresión de la GTPasa y en la Fig. 47B se representan los valores medios de la intensidad de las bandas correspondientes a Akt fosforilada normalizados con respecto a Akt total. Así, en condiciones basales se observó un aumento en los niveles de fosforilación de Akt a los 5 min de exposición a insulina, que a continuación disminuyeron de forma progresiva a lo largo del tiempo. En cambio, en células que sobreexpresan Rab18, en las que no se observaron diferencias en la cantidad total de Akt respecto a las células *mock*, la fosforilación de Akt se mantuvo elevada durante los primeros 60 min de tratamiento con insulina, momento a partir del cual comenzaron a recuperar los valores basales (Figs. 47A y 47B). A continuación, analizamos el efecto de la sobreexpresión de Rab18 sobre la diana de MAST3, PTEN, concretamente en su nivel de fosforilación (*i.e.* inactivación) (Matsuda *et al.*, 2013; Barata, 2011). Este análisis mostró que la insulina induce un incremento significativo en los niveles de fosforilación de PTEN en células que sobreexpresan Rab18 con respecto a las células *mock* (Fig. 47C). La cuantificación de este efecto reveló que, mientras que el tratamiento de las células con insulina induce un aumento, aunque no

significativo, del nivel de fosforilación de PTEN en células mock, este efecto se hizo más patente en células que sobreexpresan Rab18, alcanzando diferencias estadísticamente significativas (Fig. 47D). En conjunto, estos datos indican que la fosforilación de PTEN y, por consiguiente, la dinámica de fosforilación de Akt, se ven alteradas por la variaciones en la cantidad de Rab18 expresada por los adipocitos y sugieren que, mediante su interacción con MAST3, la GTPasa puede modular la señalización mediada por insulina en este tipo celular.

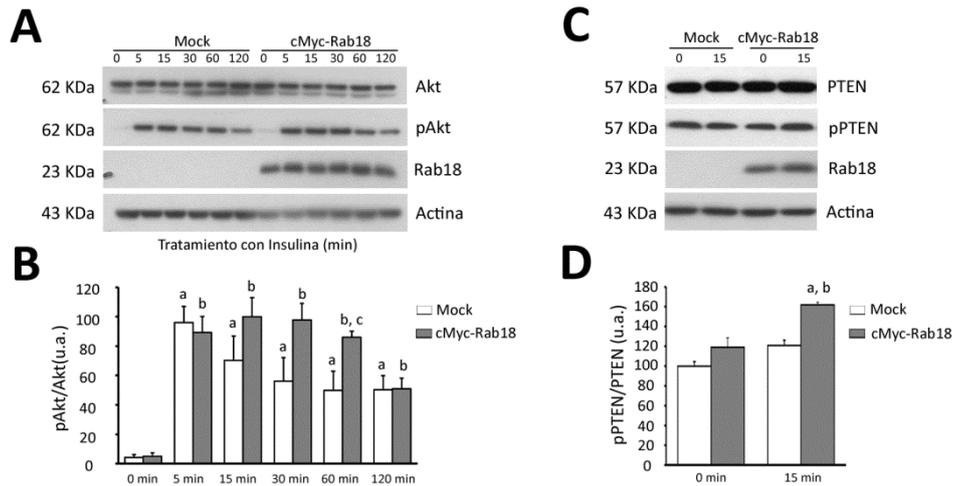


Figura 47. Efecto de la sobreexpresión de Rab18 sobre la fosforilación de Akt y PTEN en adipocitos 3T3-L1. (A) Análisis mediante *Western Blotting* de los niveles de proteína Akt total y de fosforilación de Akt en células 3T3-L1 electroporadas con cMyc-Rab18 o un vector vacío (*mock*) y sometidas a tratamiento con insulina (100 nM) durante 5, 15, 30, 60 ó 120 min. (B) Valores medios de DO del ratio de la señal pAkt/Akt. Para obtener una cinética normalizada, los valores de DO obtenidos se refirieron al valor del tiempo de 5 min tras la estimulación con insulina de las células control. ^a $P < 0,05$ vs. *mock* 0 min, ^b $P < 0,05$ vs. cMyc-Rab18 0 min, ^c $P < 0,05$ vs. *mock* 60 min. (C) Análisis de los niveles de proteína PTEN total y de fosforilación de PTEN en células 3T3-L1 electroporadas con cMyc-Rab18 o un vector vacío (*mock*) y sometidas a tratamiento con insulina (100 nM) durante 15 min. (D) Valores medios de DO del ratio de la señal pPTEN/PTEN (referidos a los valores basales en células control, 100%). ^a $P < 0,05$ vs. *mock* 0 min, ^b $P < 0,05$ vs. cMyc-Rab18 15 min.

4.5.3. Ensayo de Doble Híbrido de Levadura (Y2H)

Esta aproximación experimental nos ha permitido realizar una búsqueda más general de aquellas proteínas que interaccionan con Rab18. Para poder llevarla a cabo, se construyó en primer lugar una librería de tejido adiposo subcutáneo de rata sobre la que realizar el escrutinio de posibles efectores de Rab18. Tras comprobar que la sobreexpresión de Rab18 en levaduras fue eficaz y no resultó tóxica para las células (Fig. 48A), se procedió al emparejamiento de la cepa de levaduras transfectadas con

Rab18 con la que expresa distintos fragmentos de ADNc de la librería y se llevó a cabo la primera selección de clones positivos mediante el crecimiento de éstos en ausencia de Leu y Trp y en presencia de X- α -Gal y Aureobasidina (selección de dobles transformantes). Posteriormente se procedió al crecimiento de los clones positivos en ausencia de Leu, Trp, Ade e His y en presencia de X- α -Gal y Aureobasidina (selección de dobles transformantes con capacidad de activación de GAL4). Los clones positivos resultantes de esta segunda selección fueron chequeados por PCR para verificar la presencia de inserto en los vectores (Fig. 48B). En la Tabla 7 se muestra la lista de proteínas identificadas, incluyendo la función descrita para cada una de ellas (<http://www.genecards.org/>).

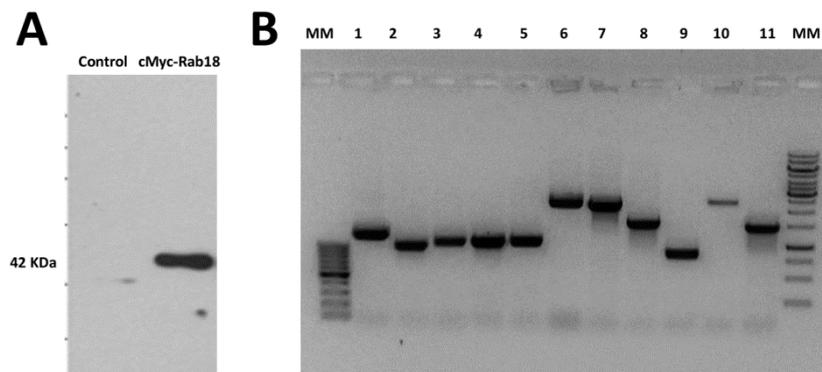


Figura 48. Análisis de la expresión de Rab18 en la cepa de levaduras Y2H Gold y *screening* por PCR de las colonias de levadura positivas tras el emparejamiento de las cepas. (A) Extractos proteicos de levaduras transformadas con el vector pGBKT7-Rab18 y el vector control pGBKT7 analizados por *Western Blotting* para cMyc. El inmunomarcaje de la membrana de nitrocelulosa con anti-cMyc reveló una banda en los extractos de levaduras transformadas con pGBKT7-Rab18 y no en el control. El peso correspondiente a esta banda es de aproximadamente 40 KDa, lo que equivale a la suma de los pesos teóricos de Rab18 y el dominio de unión al ADN de GAL4, clonado en el vector pGBKT7 en la misma fase de lectura de Rab18. (B) Las colonias que crecieron en medio QDO/X/A se picaron y se procesaron para la amplificación del cDNA de la librería clonado en la cepa Y187. La electroforesis de las mezclas de PCR resultantes demostró la presencia de secuencias de cDNA de diferentes tamaños (500-3500 pb) que corresponden a genes que codifican proteínas que presumiblemente pueden interactuar con Rab18.

Tabla 7. Proteínas identificadas mediante Y2H como posibles interactores de Rab18.

PROTEÍNA	ACRÓNIMO	NÚMERO DE ACCESO	FUNCIÓN
Regulator of G protein signalling 6	RGS6	-	Incrementa la actividad GTPasa de la subunidad alfa de proteínas G llevándolas a su estado inactivo
GTPase activating protein testicular GAP1	tGAP1	NP_001007636.2	Acelera la hidrólisis de GTP a GDP en GTPasas de bajo peso molecular
Lipid phosphate phosphatase-related protein 3	LPPR3	NP_853665.1	Fosfatasa de ácido fosfatídico que cataliza la desfosforilación de 1,2-diacilglicerol 3-fosfato
Paraplegin	SPG7	NP_852053.1	Metaloproteasa de zinc dependiente de ATP
Phosphoserine aminotransferase	PSAT1	NP_942033.2	Cataliza la conversión reversible de 3-fosfohidroxipiruvato a fosfoserina y de 3-hidroxi-2-oxo-4-fosfonooxibutanoato a fosfohidroxitreonina
Inositol 1,4,5-triphosphate receptor Type2	ITPR2	NP_112308.1	Receptor de inositol 1,4,5-trisfosfato, Segundo mensajero en la liberación de calcio intracelular regulada por AMPc dependiente e independientemente de PKA.
C-AMP responsive element modulator isoform 2	CREM	NP_059030.2	Regulador transcripcional
Tensin 3	TNS3	NP_001163930.1	Remodelado de actina
Centriolin	CNTRL	-	Progresión del ciclo celular y citocinesis. En los últimos pasos de la citocinesis, ancla el complejo del exocisto y las SNARES
Palmitoyltransferase	ZDHHC11	NP_001034431.2	Pertenece a la familia de palmitoil transferasas DHHC.
Ankyrin repeat domain-containing protein 11 isoform 2	ANKRD11	-	Recluta HDACs para inhibir la transactivación dependiente de ligando
E3 ubiquitin-protein ligase CBL-B	CBLB	NP_598285.1	Participa en la degradación de proteínas por el proteasoma. Promueve la ubiquitinación de PIK3R1/p85
Adaptin ear-binding coat-associated protein 1-like	NECAP-1	XP_006234732.1	
WD repeat domain containing protein 75	WDR75	-	Plataforma para el ensamblaje de complejos proteicos
Membrane protein FAM17413-like	-	-	
Netrin receptor UNC5D precursor	UNC5D	NP_001100789.2	Proteína relacionada con laminina
AT-rich interactive domain-containing protein 4B	ARID4B	NP_445873.1	Represor transcripcional
Syntaxin binding protein 6	STXBP6	NP_001178801.1	Modula la formación de complejos SNARE y de exocitosis funcionales
Lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor protein	LRBA	NP_001102025.1	Acoplamiento de transducción de señales y tráfico vesicular para permitir la secreción polarizada y/o la deposición en membrana de moléculas efectoras inmunes.
A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin.....	ADAMT	NP_077376.2	
Tripartite motif-containing protein	TRIM	-	Restricción retroviral. Funciona como una E3-ubiquitina ligasa y regula su propia localización celular.
E3 ubiquitin-protein ligase RNF8	RNF8	NP_001020898.1	Actúa como una ubiquitina ligasa (E3) en la ubiquitinación de determinadas proteínas nucleares.
Contactin-5 precursor	CNTN5 PREC	NP_446198.1	GPI-anchored protein.

Thyroid hormone receptor beta	THRB	-	Receptor nuclear de hormonas
Coiled-coil domain-containing protein 54-like	CCDC54	XP_001063933.1	
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C-like 1-like	LOC101060301	-	
Riboflavin kinase-like	RFK-like	XP_006234721.1	Fosforilación de riboflavina para formar flavin-mononucleótido (FMN), enzima limitante de la síntesis de FAD. Esencial para la producción de ROS inducida por TNF

Entre las proteínas identificadas, cabe destacar tGAP1, proteína reguladora de la actividad de GTPasas que se ha propuesto que acelera la hidrólisis de GTP a GDP para la inactivación de estas proteínas (Modarressi *et al.*, 2004), la palmitoiltransferasa ZDHHC11, capaz de anclar otras proteínas a membrana mediante adición de grupos lipídicos (Korycka *et al.*, 2012), LPPR3, una fosfatasa que desfosforila diversos intermediarios de la síntesis de lípidos (Bräuer *et al.*, 2003) y LRBA, que participa en procesos de fusión de membranas intracelulares gracias a su unión a fosfátidos de inositol (Wang *et al.*, 2004). De todas estas proteínas elegimos LPPR3 y LRBA para profundizar en su relación con Rab18 en el contexto del metabolismo lipídico y del tráfico intracelular de membranas.

4.5.3.1. LPPR3

LPPR3 es una enzima encargada de catalizar el paso de DAG3P a DAG, que sirve como sustrato tanto para la síntesis de TAG por parte de DGAT2 como para la síntesis *de novo* de fosfolípidos mediante la ruta de Kennedy (síntesis de PC y PE) (ver Introducción para más detalle). Para confirmar la interacción de Rab18 con LPPR3, primero llevamos a cabo estudios de inmunocitoquímica y microscopía confocal sobre adipocitos 3T3-L1 transfectados con el vector de expresión GFP-LPPR3. Como se muestra en la Fig. 49A, la señal de GFP-LPPR3 se localizó preferentemente en torno a las LDs, colocalizando en puntos concretos con la señal de Rab18. También realizamos un ensayo de inmunoprecipitación para confirmar la interacción de LPPR3 con Rab18, para lo que co-transfectamos células HEK293 con los vectores de expresión cMyc-Rab18 y GFP-LPPR3. Los extractos celulares se pasaron por una columna que contenía anticuerpo anti-cMyc y la elución se cargó en un gel de electroforesis. En la Fig. 49B se muestra la inmunotinción de las membranas para cMyc-Rab18 y GFP-LPPR3, en la que se observa la presencia de ambas proteínas en la fracción del inmunoprecipitado, lo que confirma los resultados obtenidos mediante Y2H.

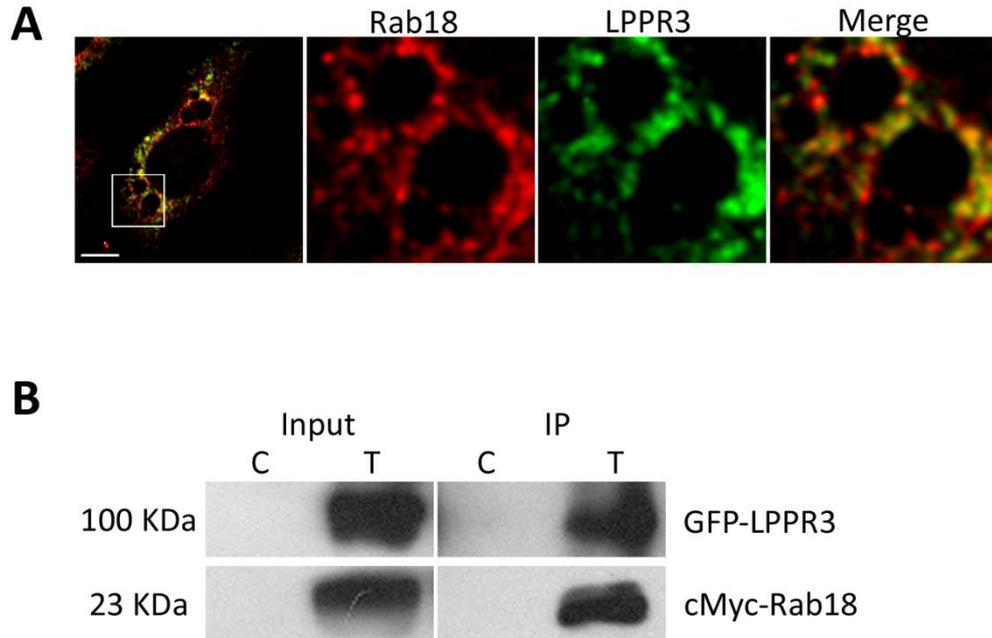


Figura 49. Confirmación de la interacción entre Rab18 y LPPR3. (A) Imagen representativa de microscopía confocal de un adipocito 3T3-L1 electroporado con el vector GFP-LPPR3 e inmunoteñido para Rab18. (B) Inmunoblots de extractos de células HEK293T transfectados con cMyc (C) o cotransfectados con cMyc-Rab18 y GFP-LPPR3 (T) e inmunoteñidos para cMyc y GFP.

Como se ha mencionado anteriormente, se ha demostrado que LPPR3 participa en la síntesis de TAGs proporcionando el sustrato para que DGAT2 catalice la conversión de DAGs a TAGs (Harris *et al.*, 2011), por lo que, a continuación, nos propusimos evaluar la distribución intracelular de LPPR3 con respecto a DGAT2 y Rab18. En la Fig. 50 se muestra un adipocito 3T3-L1 co-transfectado con FLAG-DGAT2 y GFP-LPPR3 e inmunoteñido para Rab18, donde se puede observar que, a menudo, LPPR3 coincide con las señales de DGAT2 y Rab18 en regiones concretas próximas a la superficie de las LDs. El conjunto de estos datos sugiere que LPPR3 podría formar parte de la plataforma proteica responsable formación de TAGs localizada en zonas específicas de la membrana del RE enriquecidas en DGAT2.

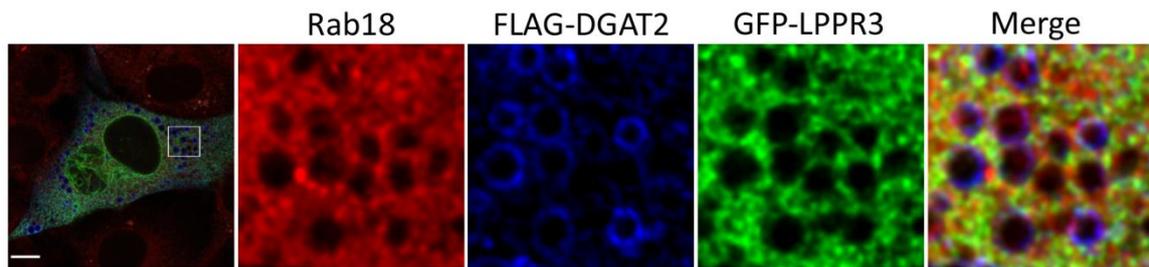


Figura 50. Colocalización de Rab18, LPPR3 y DGAT2 en adipocitos 3T3-L1. Imágenes representativas de microscopía confocal sobre células 3T3-L1 co-electroporadas con los vectores GFP-LPPR3 y FLAG-DGAT2 e inmunoteñidas frente a Rab18. Barra de escala, 5 μ m.

4.5.3.2. LRBA

LRBA es una proteína perteneciente a la familia WDW, caracterizada por poseer un dominio conservado, WDL-BEACH-WD40, en su extremo C-terminal (Wang *et al.*, 2001). Este dominio le proporciona la capacidad de unirse, además de a otras proteínas, a fosfolípidos de inositol y a la proteína quinasa A (PKA). Para analizar la posible interacción entre Rab18 y LRBA, llevamos a cabo ensayos inmunocitoquímicos y microscopía confocal sobre adipocitos 3T3-L1 transfectados con el vector de expresión GFP-LRBA. Como puede observarse en la Fig. 51, que muestra una célula representativa, el inmunomarcaje de LRBA se extendió por todo el citosol concentrándose en algunos puntos de la membrana plasmática y las LDs. De esta forma, la coincidencia espacial de las señales de Rab18 y LRBA se limitó a regiones próximas a la superficie de las LDs.

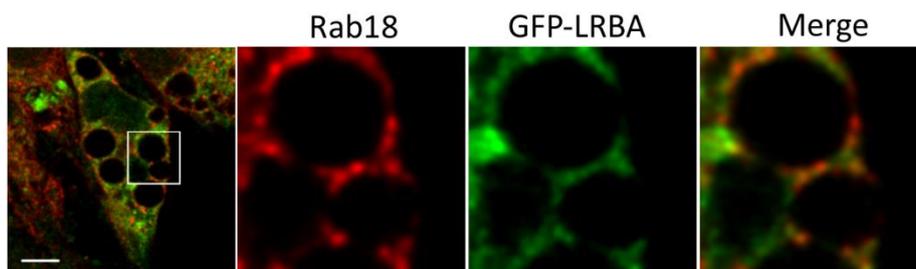


Figura 51. Distribución subcelular de LRBA. Imagen representativa de microscopía confocal de un adipocito 3T3-L1 electroporado con el vector GFP-LRBA e inmunoteñido para Rab18. Se muestran ampliaciones de la región incluida en el recuadro blanco en la imagen de la izquierda. Barra de escala, 5 μ m.

4.6. Rab18 en obesidad

4.6.1. Efecto de TNF α sobre la asociación de Rab18 a la superficie de las LDs

La acumulación de lípidos en los adipocitos que ocurre en obesidad está asociada a la liberación, por parte de éstos y por los macrófagos que infiltran el tejido adiposo en estas condiciones, de citoquinas proinflamatorias, entre las que destaca TNF α (Malagón *et al.*, 2013). En esta línea decidimos analizar el efecto de un ambiente proinflamatorio sobre la relación de Rab18 y las LDs, para lo que se trataron adipocitos 3T3-L1 con TNF α (20 ng/ml) durante 8 ó 24 h. Como se muestra en la Fig. 52A (paneles superiores), tras 8 h en condiciones basales se observó una distribución preferente de Rab18 en asociación a la superficie de las LDs, en general superior a la observada en los tiempos más cortos que se han analizado en este trabajo. Estos resultados pueden explicarse debido a la ausencia de suero durante el tiempo de tratamiento, lo que, como se mostró en apartados anteriores (ver apartado 4.1), induce un mayor reclutamiento de esta GTPasa hacia la superficie de las LDs. De esta forma, las condiciones control del estudio parten de una situación en la que está estimulada la presencia de Rab18 en la superficie de las LDs, efecto que es mucho más visible en los ensayos realizados a 24 h. Como se puede observar en las imágenes de la Fig. 52A (paneles inferiores), tras 8 h de tratamiento con TNF α la distribución de Rab18 se hizo más reticular disminuyendo su asociación con las LDs, lo que se vio reflejado en el índice de colocalización entre ambas proteínas (Fig. 52C). El tratamiento de 24 h con TNF α provocó un desplazamiento de Rab18 de la superficie de las LDs mucho más pronunciado, mostrando una disminución estadísticamente significativa con respecto a la situación control a igualdad de tiempo (Fig. 52B). Las Fig. 52C y 52D representan los valores medios del índice de colocalización entre Rab18 y PLIN tras 8 y 24 h de tratamiento con TNF α , respectivamente.

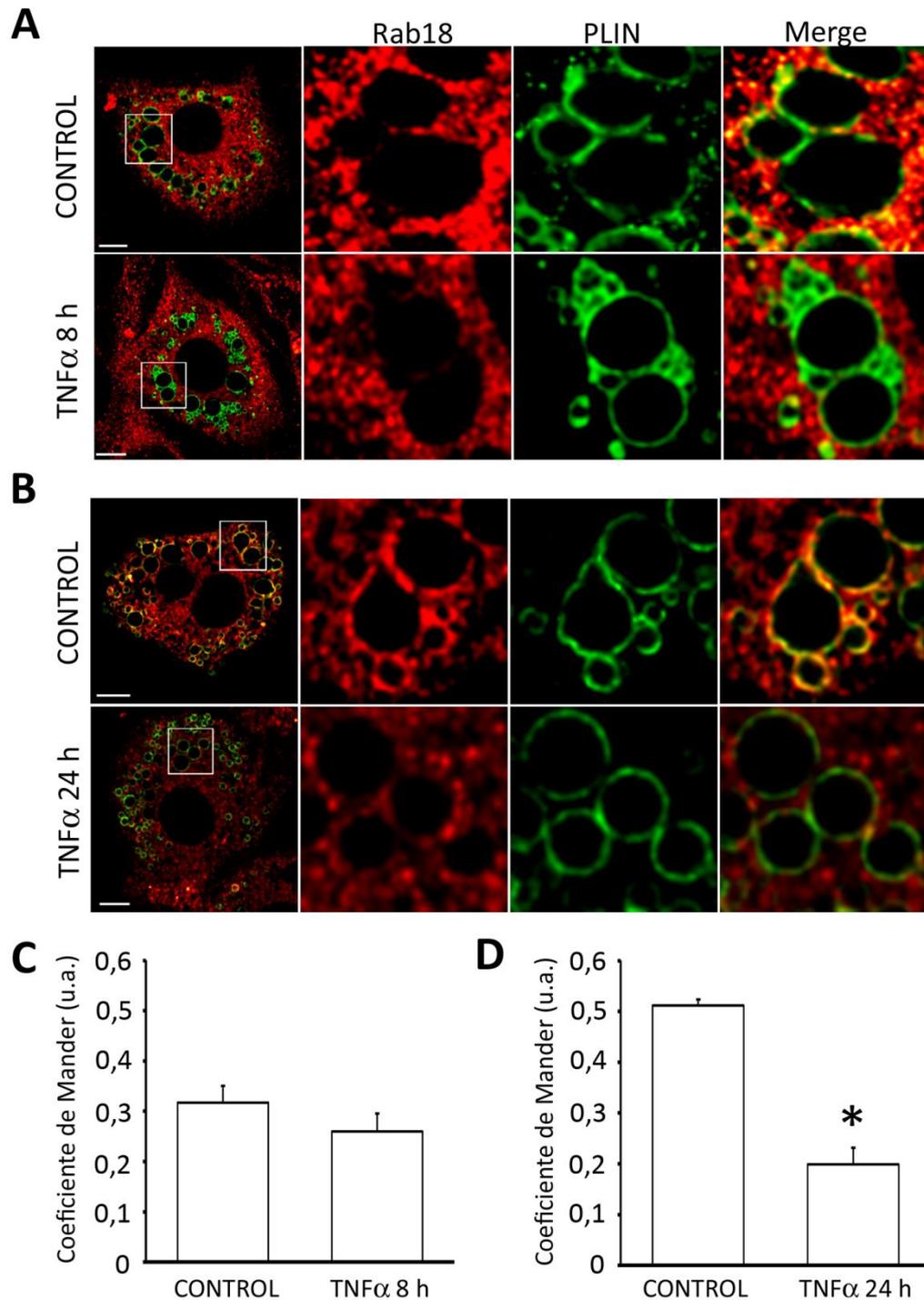


Figura 52. Localización intracelular de Rab18 en adipocitos 3T3-L1 expuestos a TNF α . Imágenes representativas de adipocitos 3T3-L1 co-inmunoteñidos para Rab18 y PLIN en condiciones basales (paneles superiores) y tras la exposición durante 8 h (A) ó 24 h (B) a TNF α (paneles inferiores) y cuantificación del grado de colocalización (C y D). Barra de escala, 5 μ m. *, $P < 0,05$ vs. control.

Para investigar si el efecto observado a nivel morfológico podría ser debido a una disminución en la expresión de Rab18 inducida por el tratamiento con $\text{TNF}\alpha$, analizamos los niveles proteicos de esta GTPasa en adipocitos 3T3-L1 tratados con esta citoquina durante 24 h. Como se muestra en la Fig. 53, y a diferencia de lo observado a nivel de imagen, $\text{TNF}\alpha$ no modificó los niveles intracelulares de Rab18.

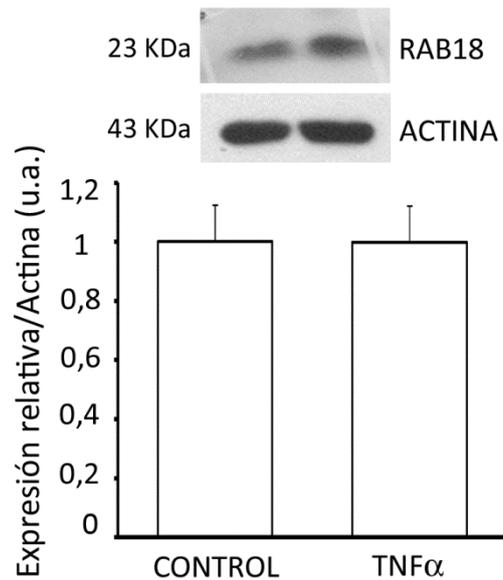


Figura 53. Efecto de un ambiente proinflamatorio en la expresión de Rab18 en adipocitos 3T3-L1. Se cuantificó el contenido proteico de Rab18 en adipocitos tratados durante 24 h con $\text{TNF}\alpha$. Los niveles de expresión en ambas condiciones se refirieron a β -actina.

El conjunto de estos resultados sugiere que $\text{TNF}\alpha$ no afecta a la expresión de Rab18, pero sí altera la distribución de esta GTPasa en adipocitos.

DISCUSIÓN

Las gotas lipídicas han sido consideradas durante mucho tiempo como simples almacenes de energía. Sin embargo, cada vez hay más estudios que apoyan firmemente la idea de que estos orgánulos constituyen estructuras altamente dinámicas y complejas, que intervienen en numerosos procesos celulares y, en el caso de las células especializadas en la reserva de energía, los adipocitos, cumplen funciones fundamentales en la regulación del metabolismo lipídico corporal (Reue, 2011). Muchos de los trabajos encaminados a establecer la naturaleza dinámica de estos orgánulos se han centrado en el análisis de la composición proteica de la cubierta de las LDs (Brasaemle *et al.*, 2004; Ding *et al.*, 2012). En concreto, diferentes estudios proteómicos han demostrado una gran diversidad de componentes en la superficie de las LDs capaces de reorganizarse en función de las condiciones metabólicas de las células. En 2004 se publicó el primer trabajo en el que se describían las modificaciones que sufre la cubierta proteica de las LDs de adipocitos 3T3-L1 en respuesta a estímulos lipolíticos (Brasaemle *et al.*, 2004). Esta aproximación experimental reveló que la estimulación de la lipólisis, además de incrementar la cantidad de proteínas que ya se encontraban asociadas a la superficie de las LDs en condiciones basales, provocaba el reclutamiento de nuevas proteínas tales como ADRP, caveolina-1 o algunos miembros de la familia de Rab GTPasas. De igual forma, el ensayo proteómico realizado en este estudio tras la estimulación lipogénica mediante el tratamiento de los adipocitos con insulina nos ha permitido corroborar que también ocurre un importante remodelado proteico en la superficie de las LDs en respuesta a este estímulo, lo que pone de manifiesto la importancia de las proteínas asociadas a estos orgánulos como mediadores en la traducción de las acciones de la insulina sobre los adipocitos. Aunque no se puede descartar que algunas de las proteínas detectadas, en condiciones basales o en respuesta a insulina, puedan corresponder a artefactos generados durante el proceso de extracción de las LDs (i.e., por rotura de las LDs y captura de proteínas hidrofóbicas por los lípidos neutros que quedan expuestos), coinciden con el patrón general de grupos de proteínas identificadas en estudios proteómicos previos (Tabla 6). En particular, detectamos la presencia de chaperonas y componentes de la maquinaria celular de degradación de proteínas asociadas a las LDs, especialmente en células tratadas con insulina. Se ha propuesto que, además de servir como almacén de proteínas propias de otros compartimentos para su posterior uso en éstos, las LDs constituyen sitios de acumulación de proteínas mal plegadas, cuyas secuencias hidrofóbicas podrían quedar protegidas mediante su unión a áreas hidrofóbicas expuestas del núcleo de las gotas (Welte, 2007). En éstas, las proteínas mal plegadas podrían ser replegadas mediante la acción de las chaperonas asociadas a las LDs o destruidas, como sugiere la presencia de una cantidad significativa de

subunidades del proteasoma que están asociadas a estos orgánulos (nuestro estudio; revisado en Welte, 2007). Alternativamente, se ha propuesto que las LDs pueden servir como sitios de tránsito para la distribución de ciertas proteínas a sus lugares de destino, en concreto, a otros orgánulos con los que las LDs establecen contactos directos, como el RE, las mitocondrias o los peroxisomas (Welte, 2007). En este escenario, y como hemos observado en nuestros estudios de videomicroscopía y de microscopía confocal (ver más adelante), es posible que al menos algunas de las proteínas detectadas en las LDs de células expuestas a insulina puedan cumplir una función en la interacción que se establece entre estos orgánulos y las mitocondrias y los peroxisomas en respuesta a esta hormona.

Por otra parte, también observamos cambios en la respuesta a insulina en relación a componentes del citoesqueleto (i.e., tubulina, vinculina, filamina) y de proteínas de tráfico intracelular (i.e., proteínas SNARE y Rabs) asociados a las LDs, lo que confirma, una vez más, la naturaleza dinámica de estos orgánulos. Entre el último grupo de proteínas citadas, hasta el momento se han identificado 19 miembros de la familia Rab asociados a la superficie de las LDs (Brasaemle *et al.*, 2008; Zehmer *et al.*, 2009; revisado en Hodges *et al.*, 2010; Ding *et al.*, 2012) y todos los ensayos proteómicos sobre LDs de diversos tipos celulares realizados hasta el momento han identificado a Rab18 como un componente abundante de la cubierta de estos orgánulos (revisado en Hodges *et al.*, 2010). Los primeros estudios de Rab18 en relación con las LDs fueron llevados a cabo en 2005 por dos grupos de investigación independientes (Martin *et al.*, 2005; Ozeki *et al.*, 2005). Estos fueron los primeros en describir el incremento en la asociación de Rab18 en las LDs, especialmente en condiciones de sobreexpresión de esta GTPasa (Ozeki *et al.*, 2005) o tras la estimulación de la lipólisis a través de receptores β -adrenérgicos inducida por isoproterenol (Martin *et al.*, 2005). Estos resultados llevaron a los autores a relacionar Rab18 con la regulación del metabolismo lipídico (Martin *et al.*, 2005; Ozeki *et al.*, 2005). Por otra parte, se observó que la sobreexpresión de Rab18 provocaba un aumento en la cantidad de membrana de RE que rodea a las LDs (Ozeki *et al.*, 2005), lo que, junto a nuestros descubrimientos de que la sobreexpresión de Rab18 también aumentaba la actividad lipolítica de adipocitos 3T3-L1 apoyaba la propuesta de que esta GTPasa podría estar implicada en la movilización de los lípidos almacenados en las LDs (Pulido *et al.*, 2011). Los resultados obtenidos en este estudio amplían estas observaciones mostrando que condiciones de deficiencia energética en las que es necesaria una mayor movilización de lípidos, como sucede en condiciones de privación de suero, constituyen, entre todos los factores investigados hasta el

momento al respecto, el estímulo que promueve un mayor reclutamiento de Rab18 a la cubierta de las LDs. Estos resultados, que apoyan las observaciones previas en relación a la actividad lipolítica de los adipocitos, permiten sugerir una relación entre la función de Rab18 y la activación de la lipólisis característica del estado de ayuno, por lo que parece razonable proponer que esta GTPasa forma parte de la maquinaria celular responsable de la activación y/o mantenimiento de la lipólisis en condiciones de restricción calórica. En apoyo de esta propuesta, estudios de expresión en tejido adiposo subcutáneo y visceral de ratones sometidos a ayuno durante distintos periodos de tiempo (8, 24 y 48 h) han puesto de manifiesto que estas condiciones inducen un significativo y mantenido incremento en los niveles de ARNm y proteína Rab18 en ambos depósitos grasos (Pulido *et al.*, 2012).

Además del papel propuesto para Rab18 como mediador en la respuesta lipolítica, estudios recientes realizados en nuestro laboratorio han permitido demostrar que Rab18 también está involucrada en la lipogénesis inducida por insulina (Pulido *et al.*, 2011). Así, esta hormona promueve, por una parte, la asociación de Rab18 a las LDs y, por otra, la interacción de las LDs cargadas con esta GTPasa con las membranas del RE (Pulido *et al.*, 2011). Estos estudios, junto con los resultados observados con isoproterenol, nos llevaron a proponer un papel dual de Rab18 en el metabolismo de las LDs como regulador tanto de procesos lipogénicos como lipolíticos (Pulido *et al.*, 2011), probablemente mediando el acercamiento de las LDs al RE y facilitando así el tráfico bidireccional de lípidos entre ambos orgánulos (Pulido *et al.*, 2011). Los resultados obtenidos en este estudio son los primeros en mostrar la dinámica de las LDs con respecto al RE y su interacción con éste en tiempo real. Así, mediante técnicas de videomicroscopía, hemos determinado el marco temporal en el que transcurre esta interacción, que sucede en cuestión de minutos tras la administración de insulina. Además, hemos observado que tanto estímulos lipogénicos como lipolíticos aumentan la colocalización de las Rab18-LDs con subdominios del RE enriquecidos en la enzima lipogénica DGAT2, encargada de catalizar el último paso de la síntesis de TAGs (Guidda *et al.*, 2011), lo que relaciona a Rab18 con zonas del RE especializadas en lipogénesis. De hecho, se ha propuesto que DGAT2, junto con la enzima FATP1/acil-CoA sintetasa, forma un complejo que actúa en la interfase RE-LD y permite el acoplamiento físico y funcional entre la síntesis de TAGs y su deposición en las LDs (Xu *et al.*, 2012). Curiosamente, un trabajo muy reciente sobre infección con el virus del Dengue, que requiere de la participación del RE y las LDs para su replicación, ha demostrado que la localización en estos orgánulos de la enzima lipogénica FAS (*fatty acid synthase*), que es necesaria para la síntesis de lípidos de membrana del

virus, es dependiente de Rab18 (Tang *et al.*, 2014), lo que refuerza la idea de la implicación de esta GTPasa en los procesos de lipogénesis.

El acercamiento observado de las Rab18-LDs a dominios del RE especializados en síntesis de TAGs, que parece razonable en respuesta a estímulos lipogénicos, resulta ciertamente paradójico en el caso de tratamientos con isoproterenol. Sin embargo, cada vez más evidencias sostienen que parte de los ácidos grasos liberados durante la respuesta lipolítica son reesterificados de nuevo de forma paralela a la lipólisis con el fin de evitar el exceso de ácidos grasos libres generados en este proceso, que podrían llegar a ser tóxicos para las células (Paar *et al.*, 2012; Ariotti *et al.*, 2012; Brasaemle *et al.*, 2004). Concretamente, la reesterificación de ácidos grasos incluye la formación de nuevas LDs, denominadas microLDs (mLDs), a partir de los ácidos grasos liberados en respuesta a la estimulación lipolítica (Paar *et al.*, 2012). Mas aún, estudios de tomografía electrónica han puesto de manifiesto que las mLDs están en íntima aposición a las membranas del RE (Ariotti *et al.*, 2012). Teniendo en cuenta estas observaciones, la unión de Rab18 a áreas de las LDs asociadas a regiones especializadas en la síntesis de TAGs (i.e., enriquecidas en DGAT2) apoya la existencia de una relación funcional entre esta GTPasa y los procesos lipogénicos que suceden en el RE. En línea con esta idea están nuestros resultados de Y2H sobre la identificación de la proteína LPPR3 como posible interactor de Rab18. De forma específica, LPPR3 es una fosfatasa que participa en un punto clave del metabolismo lipídico, ya que cataliza la formación de DAG, que constituye el sustrato tanto para la síntesis *de novo* de lípidos como para la síntesis de los fosfolípidos mayoritarios de las LDs, PC y PE, a través de la ruta de Kennedy (Bräuer *et al.*, 2003). La confirmación de la interacción entre Rab18 y la fosfatasa LPPR3 mediante inmunoprecipitación refuerza nuestra hipótesis sobre la relación de esta GTPasa con la maquinaria de síntesis lipídica. Concretamente, nuestros datos sugieren que Rab18 podría intervenir, quizás facilitando el reclutamiento de LPPR3, en la formación de DAG, proporcionando así el sustrato para DGAT2 y, con ello, la síntesis de TAGs. En apoyo de esta idea están nuestros estudios previos que demuestran que la sobreexpresión de Rab18 en células 3T3-L1 incrementa de forma significativa la acumulación de TAGs en estas células (Pulido *et al.*, 2011).

Además, nuestros resultados de doble inmunocitoquímica y microscopía confocal mostraron que Rab18 presenta cierta preferencia de asociación por las LDs de menor tamaño [entre 0,5 y 0,8 μm^2 , compatibles en tamaño con las mLDs (0,2-0,8 μm^2)]. En este sentido, cabe destacar el creciente número de evidencias experimentales que sugieren la existencia de heterogeneidad de las LDs. Esta

heterogeneidad no sólo se refiere a las proteínas o al tipo de lípidos que forman parte integral de las gotas (Digel *et al.*, 2010; Ducharme y Bickel, 2008), sino también a la capacidad de respuesta que éstas presentan frente a estímulos lipogénicos y lipolíticos (Wilfling *et al.*, 2013). Así, se ha propuesto que los adipocitos contienen dos subtipos de LDs: unas de mayor tamaño que poseen capacidad autónoma de crecimiento por adición de TAGs sintetizados localmente gracias a la presencia en su superficie de la maquinaria enzimática requerida para la síntesis de TAGs, y otras que permanecen pequeñas tras su formación inicial ya que no poseen la capacidad autónoma de producción de TAGs al carecer de las enzimas necesarias para dicho proceso (Wilfling *et al.*, 2013; Cheng *et al.*, 2009). Por otra parte, se ha demostrado que las LDs de menor tamaño son las primeras que se ven afectadas en respuesta a estímulos lipolíticos (Paar *et al.*, 2012). Como resultado de la lipólisis, se generan ácidos grasos para su liberación al exterior. Se ha propuesto que los ácidos grasos son liberados al RE, para lo que, sería necesario el contacto LD-RE (Goodman, 2008; Zehmer *et al.*, 2009). Esto, junto con nuestros datos sobre la estrecha relación espacial de las Rab18-LDs con membranas de RE enriquecidas en enzimas lipogénicas en respuesta a isoproterenol y la interacción de Rab18 con LPPR3, sugieren que esta GTPasa podría interactuar con LDs que presentan unas características morfofuncionales determinadas. En concreto, Rab18 podría asociarse preferentemente a aquellas gotas, pequeñas, que no presentan autonomía en cuanto a la síntesis de TAGs para servir de plataforma sobre la que se organice la maquinaria enzimática responsable de este proceso.

Interacción de Rab18-LDs con el citoesqueleto e incorporación de la GTPasa a las LDs

Uno de los objetivos específicos que persiguió este trabajo fue esclarecer la función específica de Rab18 en el transporte dirigido de las LDs en respuesta a estímulos lipogénicos y lipolíticos. En este contexto, se ha propuesto que las proteínas Rab actúan como intermediarios en la interacción entre las proteínas motoras asociadas a las distintas redes del citoesqueleto celular y el cargo (i.e., vesícula u orgánulo), lo que en última instancia determina la dirección de movimiento de éste a lo largo de los filamentos de actina o los haces de microtúbulos (Hammer y Wu, 2002; Yoshida *et al.*, 2011). Por otra parte, numerosos estudios han demostrado que existe una relación fundamental de las LDs con el citoesqueleto y las proteínas motoras asociadas (revisado por Horgan y McCaffrey, 2011). En línea con estas observaciones,

nuestros estudios proteómicos sobre LDs de células 3T3-L1 permitieron descubrir que, en respuesta a insulina, se produce una reorganización importante de los componentes del citoesqueleto asociados a la superficie de las LDs, lo que está en consonancia con la importancia del citoesqueleto en la dinámica de estos orgánulos. Por ejemplo, se ha demostrado que la reorganización de la red de actina desde fibras de estrés a actina cortical que ocurre a lo largo del proceso de adipogénesis es necesaria para que este proceso transcurra adecuadamente (Yang *et al.*, 2013). No obstante, en nuestro estudio, que se centró en células diferenciadas que presentan fundamentalmente actina cortical, no encontramos coincidencia espacial de las Rab18-LDs con el córtex de actina ni efecto alguno de la desorganización de éste sobre la asociación de la GTPasa a las gotas. Por tanto, no parece probable que la red de actina esté implicada en la dinámica de las LDs que contienen Rab18 y/o que esta GTPasa traduzca su acción sobre las LDs a las que se asocia mediante su interacción con las proteínas motoras asociadas a los filamentos de actina.

Por otra parte, se ha propuesto que la red de microtúbulos es esencial para la biogénesis y el crecimiento de las LDs. Además, media el movimiento de las LDs, aunque, son sólo las LDs pequeñas las que exhiben grandes movimientos direccionales dentro de la célula, mientras que la gran LD característica de los adipocitos ocupa la mayor parte del citosol por lo que presenta una movilidad muy limitada dentro de la célula (Welte *et al.*, 2009; Reue *et al.*, 2011). En línea con esto, nuestros estudios de doble inmunocitoquímica para Rab18 y β -tubulina en adipocitos 3T3-L1 que, como hemos mostrado, contienen LDs de distintos tamaños, revelaron que la red de microtúbulos mantiene una relación estrecha con las Rab18-LDs, encontrando a menudo haces de microtúbulos rodeando a la superficie de estos orgánulos decorada con Rab18. En este sentido, muchos miembros de la familia de proteínas Rab dependen de la red de microtúbulos para su asociación a las membrana diana (revisado en Horgan *et al.*, 2011). De hecho, estudios de nuestro laboratorio han mostrado que la despolimerización de la red de microtúbulos con nocodazol previene la unión de Rab18 a la superficie de los gránulos de secreción, a los que esta GTPasa se asocia en células neuroendocrinas (Vázquez-Martínez *et al.*, 2007; y datos no publicados). Sin embargo, en nuestro estudio el tratamiento de adipocitos 3T3-L1 con nocodazol no afectó la capacidad de asociación de Rab18 a las LDs, que fue reclutada igualmente en respuesta a estímulos tanto lipogénicos como lipolíticos, ni alteró el tamaño de las gotas. De acuerdo con estos resultados, Murphy y colaboradores han demostrado que, en este mismo tipo celular, el nocodazol no afecta ni la morfología ni el tamaño de las LDs, y tampoco altera el movimiento de las gotas (Murphy *et al.*,

2009). El conjunto de estos resultados sugiere que la relación de Rab18 con las LDs no requiere de la presencia de una red de microtúbulos íntegra. Sin embargo, el tratamiento de los adipocitos con la droga BFA sí afectó a la presencia de Rab18 en la superficie de las LDs, lo que sugiere que la integridad del sistema RE-Golgi, que es el que se ve afectado por BFA (Lippincott-Schwartz, 1993) es indispensable para que la GTPasa alcance su destino. Varios trabajos han descrito la presencia en las LDs de proteínas Rab que participan en el tráfico intracelular de vesículas entre el RE y el aparato de Golgi, como es el caso de Rab1 (Sacher *et al.*, 2008), lo que ha llevado a proponer que parte de las proteínas de la cubierta de las LDs podrían alcanzar éstas vía tráfico vesicular desde el aparato de Golgi (Beller *et al.*, 2008; Soni *et al.*, 2009). En concreto, se ha propuesto que el transporte de ATGL y ADRP a las LDs ocurre a través de un tráfico vesicular dependiente de COPI y la GTPasa de las membranas del aparato de Golgi, Arf1 (Beller *et al.*, 2008; Soni *et al.*, 2009). Sin embargo, este tráfico vesicular es dependiente de microtúbulos (Murshid y Presley, 2004), por lo que no explicaría cómo ocurre el transporte de Rab18 hacia LDs, proceso que, como hemos observado en este estudio, ocurre incluso con la red celular de microtúbulos despolimerizada mediante el uso de nocodazol.

Alternativamente, otros trabajos han propuesto la existencia de una segregación lateral directa de ciertas proteínas desde las membranas del RE hacia la monocapa de fosfolípidos de las LDs, proceso que es independiente del tráfico vesicular basado en microtúbulos (Pol *et al.*, 2014). Así, ensayos de *fluorescence recovery after photobleaching* (FRAP) y *fluorescence loss in photobleaching* (FLIP) han permitido demostrar que proteínas clave en el metabolismo lipídico, como GPAT4, AGPAT3, PAP o DGAT2, pueden difundir lateralmente desde las membranas de RE hacia las LDs de nueva formación (Kuerschner *et al.*, 2008; Stone *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011; Wilfling *et al.*, 2013). Este mecanismo de asociación a las LDs es común también en levaduras, en las que se ha sugerido que las LDs presentan puentes membranosos que las comunican con el RE (Szymanski *et al.*, 2007; Jacquier *et al.*, 2011; Wolinski *et al.*, 2011). Así, proteínas como Erg6 (implicada en la ruta de biosíntesis de ergosterol) o Dga1 (correspondiente a DGAT2) podrían difundir reversiblemente entre el RE y las LDs en función de las condiciones metabólicas de estas células (Jacquier *et al.*, 2011). Así pues, aunque hasta la fecha no existen datos experimentales sobre el efecto de BFA en la incorporación de proteínas a la cubierta de las gotas mediante difusión lateral desde las membranas del RE, sería razonable proponer que la desestabilización del RE provocada por esta droga podría alterar este proceso y, con ello, la transferencia de Rab18 hacia las gotas inducida por estímulos

lipogénicos o lipolíticos. En este sentido, un trabajo muy reciente propone la idea de que, además de participar en la gemación de vesículas, Arf1/COPI podría regular el establecimiento de puentes entre el RE y las LDs, controlando así el tráfico de proteínas como ATGL o DGAT2 desde el RE hasta las gotas (Wilfling *et al.*, 2014). Estos resultados, junto con nuestras observaciones en adipocitos 3T3-L1 tratados con BFA permiten sugerir que, al igual que las enzimas mencionadas, Rab18 podría ser transferida desde el RE a las LDs. Curiosamente, estudios en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) han demostrado que las proteínas Rab que contienen el motivo COOH-terminal de prenilación CAAX, incluida Rab18, requieren de su paso por el RE para su activación y transferencia a membrana (Leung *et al.*, 2007; Gerondopoulos *et al.*, 2014), por lo que es posible que este proceso, caso de que ocurriera también en adipocitos, esté también alterado en células expuestas a BFA.

Es interesante resaltar que uno de los trabajos citados, publicado por el grupo del Dr. Barr (Gerondopoulos *et al.*, 2014), propone que Rab18 es importante para el mantenimiento de la estructura del RE, ya que la depleción de esta proteína o de la proteína Rab3GAP, que identifican en este trabajo como una GEF de Rab18, provoca la disrupción de la red tubular del RE, concretamente induce la expansión de las cisternas del RE hacia la periferia celular. Estos autores suponen que los efectores de Rab18 podrían actuar regulando el *tethering* y fusión de los túbulos del RE o, alternativamente, inhibir la expansión de este orgánulo (Gerondopoulos *et al.*, 2014). Como se ha mencionado en párrafos anteriores, en estudios previos demostramos que el silenciamiento de Rab18 en adipocitos 3T3-L1 diferenciados provocaba una disminución de la actividad lipogénica de estas células (Pulido *et al.*, 2011). No realizamos estudios estructurales en las células silenciadas pero, teniendo en cuenta los resultados de Gerondopoulos y colaboradores, cabría la posibilidad de que la disminución de la lipogénesis en células silenciadas pudiera deberse, al menos en parte, a una alteración en el RE provocada por la carencia de una concentración adecuada de Rab18 y/o de sus efectores. En este contexto, y teniendo en cuenta la posible función de Rab18 como factor de reclutamiento de LPPR3/DGAT2 para organizar plataformas de síntesis lipídica, su presencia en puntos de contacto LD-RE podría ser relevante para la organización estructural de áreas concretas del RE. No obstante, nos parece altamente improbable que Rab18 pudiera tener una función específica en el mantenimiento de la estructura global y/o la expansión del RE en adipocitos, en los que Rab18 está asociada a las LDs y aunque cercana, no parece unirse de forma extensiva a las membranas del RE (notablemente, en células 3T3-L1 en diferenciación, en las que la estructura del RE es claramente observable con

anticuerpos contra calnexina o PDI). De hecho, es importante resaltar que los estudios de Gerondopoulos y colaboradores se realizaron en células COS7 y células Hela, que son claramente diferentes a los adipocitos, y en las que Rab18 se localiza asociado al RE. Más aún, el tratamiento de estas células con oleato provocó la formación de LDs pero, sorprendentemente, éstas no se marcaban con proteína Rab18 exógena fusionada con el reportero mCherry. Por el contrario, en estas células, Rab18 se asociaba a las cisternas tubulares de RE cercanas a las LDs formadas en respuesta a oleato. En este contexto, la localización de Rab18 es altamente dependiente del tipo celular, lo que también determina su función específica en cada tipo de célula, que varía desde la regulación de la homeostasis de las LDs (adipocitos) hasta la regulación del tráfico de gránulos de secreción (células neuroendocrinas) (Vázquez-Martínez *et al.*, 2007) o entre RE y aparato de Golgi (células de tipo epitelial, Vero y NRK) (Dejgaard *et al.*, 2008). Estas diferencias deben estar relacionadas, a su vez, con las proteínas reguladoras y efectoras que se asocian con Rab18 y que, en último término, traducen su acción. Como se ha mencionado en párrafos anteriores, Rab18 depende de su interacción con la red de microtúbulos para asociarse a los gránulos de secreción en células de feocromocitoma PC12 y, de hecho, estudios de FRET nos han permitido demostrar la unión directa de Rab18 con los componentes del complejo motor asociados a microtúbulos, dineína y Huntingtina, en estas células (datos no publicados), mientras que esta interacción con el citoesqueleto (ni su vinculación con vesículas secretoras) no parece evidente en adipocitos.

En conjunto, los resultados obtenidos sobre Rab18-LDs y RE, junto con los publicados anteriormente, confirman y extienden la importancia de la interacción entre los dos componentes celulares, LDs y RE, en particular mediada por Rab18, en la regulación del metabolismo lipídico de los adipocitos.

Interacción de las Rab18-LDs con mitocondrias y peroxisomas

El RE no es el único orgánulo que establece asociación con las LDs. Ya en los estudios de microscopía electrónica de Novikoff y colaboradores realizados en 1980 sobre adipocitos 3T3-L1 se demostró que otros orgánulos celulares relacionados con el metabolismo lipídico, como las mitocondrias y los peroxisomas, mantienen contactos directos con las LDs (Novikoff *et al.*, 1980). Sin embargo, las consecuencias funcionales de la asociación de estos orgánulos con las LDs han sido poco exploradas. Teniendo en cuenta estas observaciones y nuestros datos sobre Rab18 en asociación a las LDs, en el presente trabajo nos planteamos investigar la posible relación de las Rab18-LDs con

mitocondrias y peroxisomas, especialmente en respuesta a estímulos lipogénicos y lipolíticos.

Con respecto a la relación espacial de mitocondrias y Rab18-LDs, nuestros estudios de videomicroscopía sobre células vivas y de microscopía confocal sobre células fijadas mostraron un cierto grado de colocalización entre ambas estructuras ya en condiciones basales. Notablemente, el tratamiento tanto con insulina como con isoproterenol provocó un aumento de la presencia de mitocondrias en torno a las Rab18-LDs, fenómeno que ocurrió en cuestión de minutos tras la administración de los tratamientos (según nuestros estudios de videomicroscopía) y que se mantuvo durante horas (observable en células fijadas tras 2-4 h de exposición a estos compuestos). Estudios *in vitro* con extractos celulares enriquecidos en mitocondrias y LDs han revelado que se produce una mayor interacción entre estos orgánulos en presencia de GTP, por lo que se ha propuesto la implicación de proteínas Rab GTPasas en este proceso (Pu *et al.*, 2011). Está ampliamente aceptado el papel común de las proteínas Rab en el *tethering*, anclaje y eventualmente fusión de distintos compartimentos celulares de membrana mediante su acción concertada con las maquinarias de *tethering* y de fusión presentes en estos compartimentos (Kawasaki *et al.*, 2005). Teniendo en cuenta el conjunto de nuestros resultados, es razonable proponer que Rab18 podría facilitar el acercamiento físico de las mitocondrias a áreas concretas de la superficie de las LDs. Esta asociación podría tener lugar para facilitar la transferencia de ácidos grasos desde las LDs a las mitocondrias, lo que estaría de acuerdo con la propuesta de un papel común para Rab18 en el tráfico de lípidos entre distintos compartimentos celulares (Ozeki *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2005; Pulido *et al.*, 2011). En el caso del efecto inducido por el isoproterenol, la hidrólisis de TAGs en las Rab18-LDs se podría acoplar a la β -oxidación de ácidos grasos resultantes. Notablemente, en músculo esquelético se ha observado que la interacción entre LDs y mitocondrias aumenta considerablemente tras la estimulación de la hidrólisis de TAGs inducida por ejercicio físico (Tarnopolsky *et al.*, 2007). Cabe destacar que el acercamiento de las mitocondrias a las Rab18-LDs encontrado en este estudio dependió del tamaño de las gotas, siendo las de menor tamaño las que acumularon más mitocondrias. De acuerdo con estas observaciones y como se ha mencionado anteriormente, en adipocitos 3T3-L1 las LDs más pequeñas parecen ser las primeras en responder a estímulos lipolíticos (Paar *et al.*, 2012).

Como se discutió en relación a la interacción entre Rab18-LDs y RE, nuestros resultados y los de otros autores apoyan la posibilidad de que se produzca un acoplamiento entre los procesos de lipólisis y lipogénesis en respuesta a isoproterenol.

En este escenario, la energía resultante de la β -oxidación de los ácidos grasos derivados de la hidrólisis de los TAGs inducida por isoproterenol podría servir, entre otros procesos, para promover la lipogénesis subsecuente. Así, por ejemplo, la asociación de CoA a los ácidos grasos para su activación previa antes de incorporarse a los TAGs, que es catalizada por acil-CoA sintetas presentes en la superficie de orgánulos como el RE y las mitocondrias, requiere ATP (Stone *et al.*, 2009). En relación con estos datos, nuestros resultados en células 3T3-L1 expuestas a insulina sugieren que la interacción Rab18-LDs con las mitocondrias podría ser importante para promover la acumulación de TAGs en las gotas. Por otra parte, se ha propuesto que, el aumento de la incorporación de TAGs en las LDs inducido por estímulos lipogénicos debe estar acompañado por un incremento proporcional del contenido de fosfolípidos en su cubierta que permita su expansión (Pol *et al.*, 2014), así como un remodelado de éstos (Penno *et al.*, 2013), para lo que se requeriría la actividad biosintética de fosfolípidos de las mitocondrias. Por tanto, y siguiendo con la idea del papel de Rab18 como mediador de la interacción entre los compartimentos celulares relacionados con el tráfico de lípidos, la interacción de las Rab18-LDs con las mitocondrias en respuesta a insulina podría facilitar la transferencia de fosfolípidos desde las mitocondrias hacia las gotas y permitir así el crecimiento que acompaña a la expansión de éstas durante la lipogénesis.

Específicamente, las mitocondrias representan la principal fuente de PE que compone las membranas celulares (Osman *et al.*, 2011). La transferencia de PE desde las mitocondrias al RE ocurre en zonas especializadas de este orgánulo enriquecidas en enzimas de síntesis de fosfolípidos, las *mitochondria associated membranes* (MAMs) (Raturi y Simmens, 2012). Curiosamente, PE constituye el segundo componente mayoritario de la monocapa de fosfolípidos que delimita las LDs (Leber *et al.*, 1994; Tauchi-Sato *et al.*, 2002; Chitraju *et al.*, 2012). En nuestros ensayos proteómicos, identificamos la proteína de unión a PE, PEBP1, como un componente abundante de la cubierta de las LDs en adipocitos estimulados con insulina, lo que sugiere que podría ser este fosfolípido el que aportara la mitocondria a la gota para que ésta aumente de superficie de una manera equilibrada a la incorporación de TAGs. Por otra parte, varios estudios han demostrado que DGAT2 y otras enzimas clave implicadas en la lipogénesis se acumulan en las MAMs, por lo que se ha propuesto que estas regiones del RE constituyen zonas especializadas en lipogénesis (Stone *et al.*, 2009; Brasaemle y Wolins, 2012). Más aún, la estimulación de la lipogénesis mediante el tratamiento con oleato promueve la localización de DGAT2, que es una proteína transmembrana residente en el RE, cerca de la superficie de las LDs, donde colocaliza con las

mitocondrias (Stone *et al.*, 2009). Estas observaciones, junto con nuestros resultados sobre la asociación de las Rab18-LDs con zonas del RE enriquecidas en DGAT2 y la interacción de la GTPasa con LPPR3, sugieren que Rab18 podría jugar un papel en la relación funcional entre las Rab18-LDs y las MAM, proporcionando una plataforma de intersección entre las rutas enzimáticas de síntesis de TAGs y de fosfolípidos.

Como en el caso del RE y las mitocondrias, nuestros estudios han demostrado que los tratamientos con insulina o con isoproterenol también inducen la aproximación de un tercer orgánulo implicado en el metabolismo de los lípidos, los peroxisomas, a las Rab18-LDs, tanto a corto como a largo plazo. Como se ha comentado en la Introducción, los peroxisomas están involucrados en la síntesis de éter-fosfolípidos, particularmente plasmalógenos (Wanders y Waterham, 2006), importantes componentes de la superficie lipídica de las LDs y esenciales para su formación y mantenimiento (Brites *et al.*, 2011). En línea con esto, un estudio previo ha demostrado que los fibroblastos de ratones embrionarios deficientes en una de las enzimas peroxisomales de síntesis de éter-fosfolípidos poseen menos LDs y de menor tamaño que las presentes en fibroblastos de ratones control, efecto que se revierte tras la administración del éter-fosfolípido alquil-glicerol (Brites *et al.*, 2011). De hecho, se ha descrito que la adipogénesis está asociada con un incremento tanto de varias actividades enzimáticas propias de los peroxisomas (Hajra *et al.*, 2000) como del número de peroxisomas en adipocitos 3T3-L1 (Novikoff y Novikoff, 1982; Novikoff *et al.*, 1980). Más aún, PexRAP, una proteína necesaria para la síntesis de alquil éter-fosfolípidos que está asociada a peroxisomas y que se expresa de forma abundante en el tejido adiposo blanco, se induce durante la adipogénesis y su eliminación en ratones da lugar a una disminución de la expresión de los genes regulados por PPAR γ y previene el aumento del tejido adiposo en respuesta a una dieta rica en grasa (Lodhi *et al.*, 2012).

Adicionalmente, estudios lipidómicos comparativos recientes de membranas aisladas a partir de tejido adiposo de pares de gemelos con distinto peso corporal (delgados y obesos) han puesto de manifiesto que, en obesidad, se produce un importante remodelado de las membranas de tejido adiposo, en particular un incremento de los niveles de éter-fosfolípidos, principalmente plasmalógenos, respecto a lo observado en individuos delgados (Pietiläinen *et al.*, 2013). En conjunto, estos y nuestros resultados, permiten sugerir que la interacción de las Rab18-LDs con los peroxisomas inducida en respuesta a estímulos podría favorecer la transferencia de éter-fosfolípidos sintetizados en los peroxisomas hacia la superficie de las LDs para permitir el remodelado de las mismas. De nuevo, Rab18, mediante su interacción con

distintos efectores, podría actuar fijando la localización de las LDs en aposición con los orgánulos responsables del mantenimiento de la estructura y función de las gotas. De forma interesante, algunas de las etapas de la síntesis de éter-fosfolípidos se realizan en conjunción entre peroxisomas y el RE (Wanders *et al.*, 2010b), lo que está en consonancia con la importancia de la acción funcional concertada llevada a cabo por estos dos orgánulos.

Otro papel importante de los peroxisomas en relación al metabolismo lipídico es la β -oxidación de ácidos grasos (revisado en Wanders y Waterham, 2006). De hecho, se ha propuesto que la aproximación de peroxisomas a las LDs observada en levaduras promueve el acoplamiento de la hidrólisis de TAGs acumulados en las gotas con la β -oxidación de ácidos grasos que tiene lugar en los peroxisomas (Binns *et al.*, 2006). En particular, los peroxisomas llevan a cabo la β -oxidación de ácidos grasos ramificados o de cadena muy larga (revisado en Wanders *et al.*, 2010). Además de ser catabolizados, una vez incorporados por las células, estos ácidos grasos pueden incorporarse en diversos tipos de lípidos, incluyendo TAGs, ésteres de colesterol o en las principales especies de fosfolípidos (Jai *et al.*, 2007). Una de las enzimas características de los peroxisomas es la catalasa, cuya actividad es fundamental para eliminar el H_2O_2 generado en las diferentes reacciones de oxidación que tienen lugar en este orgánulo, especialmente por la acil-CoA oxidasa que participa en la β -oxidación de ácidos grasos (Schrader y Fahimi, 2006). Teniendo en cuenta estos datos y nuestros resultados sobre la interacción física de Rab18-LDs con peroxisomas, nos planteamos la posibilidad de que Rab18 pudiera jugar un papel en la función de estos orgánulos, para lo que evaluamos el efecto de la sobreexpresión de la GTPasa sobre la actividad catalasa en adipocitos 3T3-L1. Estos estudios mostraron que niveles elevados de Rab18 (y su subsecuente asociación a las LDs) provocan un aumento significativo de la actividad catalasa en estas células, lo que sugiere que Rab18, o el acercamiento de peroxisomas a LDs mediado por la GTPasa, podría favorecer la actividad de los peroxisomas. Como se ha mencionado, la catalasa cataliza la detoxificación de H_2O_2 , lo que supone uno de los mecanismos más importantes en la eliminación de ROS intracelulares (Schrader *et al.*, 2006). Nuestros experimentos sobre células 3T3-L1 que sobreexpresan Rab18 han mostrado una disminución significativa de los niveles intracelulares de ROS en estas condiciones, lo que es consistente con el aumento de la actividad catalasa inducido por Rab18. En línea con estos descubrimientos está la propuesta de que los peroxisomas participan no sólo en la generación de ROS, sino también en la protección de las células frente a los efectos deletéreos causados por estos compuestos (Schrader y Fahimi, 2006).

Está ampliamente descrito que, en condiciones de inflamación (i.e., infección o daño por isquemia-reperfusión), que están normalmente asociadas a la existencia de estrés oxidativo, se produce una disminución significativa de la densidad de peroxisomas y de la actividad de varias de sus enzimas (Schrader y Fahimi, 2006). Aunque no se ha estudiado aún la dinámica de los peroxisomas en tejido adiposo en condiciones de obesidad, es razonable especular con la posibilidad de que la obesidad, que se caracteriza por la existencia tanto de estrés oxidativo como de inflamación en dicho tejido (Furukawa *et al.*, 2004; Balistreri *et al.*, 2010), conlleve también una alteración del número y/o la función de los peroxisomas de los adipocitos. Notablemente, nuestros estudios previos sobre Rab18 en relación a obesidad genética o inducida por dieta, mostraron que la expresión de la GTPasa se encontraba fuertemente aumentada tanto en ratones como en humanos obesos en comparación con animales o individuos delgados (Pulido *et al.*, 2011; Pulido *et al.*, 2013). Teniendo en cuenta estas observaciones, junto con nuestros resultados sobre el aumento de la actividad catalasa y reducción de los niveles de ROS en células 3T3-L1 que sobreexpresan Rab18, se puede proponer que el aumento de los niveles de Rab18 que ocurren en obesidad podría acoplarse a la activación de los peroxisomas y servir así como un mecanismo compensatorio que ayude al tejido adiposo a adaptarse además a una situación de alto estrés oxidativo. No obstante lo anterior, es posible que, a pesar del aumento de la cantidad de Rab18, esta GTPasa no esté funcional en adipocitos en obesidad, como apuntan nuestros datos sobre GDI2 y TNF α (ver más adelante).

En conjunto, los resultados sobre la dinámica del RE, de las mitocondrias y de los peroxisomas con respecto a las Rab18-LDs, permiten sugerir un papel general de la GTPasa en el posicionamiento de dichas gotas en relación a los orgánulos involucrados en la regulación del metabolismo lipídico, con el fin de acoplar la remodelación de las LDs (i.e., incorporación y/o movilización de TAGs y otros lípidos complejos) a otros procesos celulares que tienen lugar en dichos orgánulos. Teniendo en cuenta la relación espacial y funcional existente entre RE y mitocondrias y peroxisomas (Lynes y Simmens, 2011), y entre Rab18-LDs y estos tres compartimentos celulares, cabe la posibilidad de que esta GTPasa pueda jugar un papel importante en la interfaz entre dichos orgánulos, sirviendo como puente entre las LDs y zonas concretas del RE relacionadas con mitocondrias (i.e., las MAM) y peroxisomas. Aunque, hasta el momento, no se han descrito regiones concretas de asociación de peroxisomas a RE (es decir, no se han descrito marcadores específicos que definan estos sitios de interacción), es interesante que las MAM contienen enzimas implicadas en la activación de los ácidos grasos de cadena muy larga, un proceso necesario para su

posterior catabolismo (β -oxidación) o anabolismo (síntesis de lípidos complejos), como la enzima FATP4, que está también asociada a mitocondrias y a peroxisomas (Jia *et al.*, 2007).

Identificación de reguladores y efectores de Rab18

En general, las proteínas Rab actúan en conjunción con un amplio rango de proteínas accesorias que bien regulan la actividad de las proteínas Rab o son reguladas por la activación de éstas. Este último grupo de proteínas (los efectores de proteínas Rab) es el responsable de traducir la función específica de las proteínas Rab en la organización del sistema de endomembranas (Stenmark, 2009). Así pues, para profundizar en la función específica de Rab18 en adipocitos, hemos llevado a cabo una estrategia múltiple para identificar interactores específicos de esta GTPasa en adipocitos 3T3-L1. Nuestros análisis de inmunoprecipitación nos permitieron aislar MAST3 como posible interactor directo o indirecto (como parte de un complejo común) de Rab18. Esta proteína es una Ser/Thr quinasa que fosforila a PTEN, una fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa que, por tanto, disminuye los niveles intracelulares de PIP3 y, en consecuencia, actúa como un regulador negativo de la ruta Akt (Matsuda *et al.*, 2013). Esta ruta es fundamental en la acción de la insulina (Pal *et al.*, 2013) por lo que la fosforilación de PTEN inducida por MAST3, que provoca la inhibición de su actividad (Valiente *et al.*, 2011), actuaría favoreciendo la señalización intracelular mediada por insulina. De hecho, se ha demostrado que PTEN actúa como un regulador negativo de la señalización de insulina y del metabolismo de la glucosa en el tejido adiposo (Kurlawalla-Martinez *et al.*, 2005). En este contexto, nuestros experimentos en adipocitos 3T3-L1 mostraron que, aunque la sobreexpresión de Rab18 no produce cambios en la fosforilación (i.e. inactivación) basal de PTEN, el ratio pPTEN/PTEN sí incrementa de forma significativa en respuesta a insulina en células que expresan niveles elevados de esta GTPasa. Estos datos son consistentes con el aumento observado en la activación de Akt (ratio pAkt/Akt total) inducida por insulina en células que sobreexpresan Rab18, apoyando una acción de esta GTPasa sobre la actividad de PTEN, presumiblemente mediada por la interacción entre Rab18 y MAST3. Además de su función canónica en el tráfico de membranas, también se ha documentado un papel de las proteínas Rab en procesos de señalización celular (Bucci y Chiariello, 2006; Jean y Kiger, 2012; Esseltine y Ferguson, 2013; Numrich y Ungermann, 2014). Así, por ejemplo, se ha demostrado que Rab5 media procesos de señalización en las membranas de los endosomas tempranos, siendo necesaria para la

interacción de la ubiquitina ligasa Ndfip con PTEN, lo que se traduce en la ubiquitinación de PTEN y su subsecuente tráfico al núcleo (Li *et al.*, 2014). Además, también se ha propuesto que la asociación en *Plasmodium falciparum* de Rab5 y Rab7 con la PKA-C podría regular la función de endosomas tempranos y tardíos (Ben Rached *et al.*, 2012). Igualmente, miembros de la subfamilia de Rab8 de *Arabidopsis* interaccionan con la quinasa PIP5K2, aumentando con ello su actividad, lo que se ha sugerido que permite la producción localizada de PIP2 en la membrana plasmática (Camacho *et al.*, 2009). Finalmente, la proteína Rab32 se une directamente a la subunidad reguladora de tipo II de la PKA, funcionando por tanto como una proteína de anclaje de la PKA (*A-kinase anchoring protein*, AKAP), lo que se ha demostrado que es importante para la regulación de la fisión mitocondrial mediada por la GTPasa (Alto *et al.*, 2002).

Adicionalmente, nuestro ensayo de Y2H permitió la identificación de la *E3 ubiquitin-protein ligase CBL-B*, como posible interactante de Rab18. Concretamente, CBL-B ubiquitina p85 (Fang *et al.*, 2001), la subunidad reguladora de la PI3K que media el reclutamiento de PTEN a membranas para desfosforilar PIP3 y así inhibir la señalización de insulina (Li *et al.*, 2014). Así pues, el conjunto de nuestros resultados apoya que Rab18 puede actuar como un modulador indirecto de la acción de la insulina en adipocitos mediante su interacción con MAST3 y CBL-B, lo que, presumiblemente, conlleva la activación de estas proteínas. A favor de esta hipótesis están nuestros estudios funcionales anteriores que revelaron que el silenciamiento de la GTPasa bloqueó el efecto estimulador de la insulina en la acumulación de TAGs en adipocitos (Pulido *et al.*, 2011), lo que podría deberse, al menos en parte, a la pérdida de una interacción funcional de Rab18 con MAST3 (y, quizás también con CBL-B).

En relación con procesos de señalización, un posible efector de Rab18 identificado en este estudio mediante Y2H es la proteína *lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor* (LRBA), lo que relaciona además a esta GTPasa con la regulación del metabolismo lipídico. Esta interacción fue apoyada por nuestros ensayos inmunocitoquímicos, que demostraron que LRBA comparte localización intracelular con Rab18-LDs. LRBA presenta en su secuencia dominios de interacción con PKA y, por tanto, se ha propuesto que participa en la señalización mediada por AMPc (Wang *et al.*, 2001). En concreto, LRBA se asocia con PKA en condiciones de reposo, mientras que tras la estimulación de la producción de AMPc, el nucleótido se une a PKA provocando la desorganización del complejo y permitiendo así que la quinasa fosforele proteínas diana *downstream* en esta ruta de señalización (Wang *et al.*, 2001). Como se ha mencionado en la Introducción, en adipocitos la lipólisis mediada por la activación

de receptores β -adrenérgicos utiliza la ruta de señalización intracelular AC/AMPC/PKA para activar la HSL y así aumentar la hidrólisis de TAGs (Duncan *et al.*, 2007). Nuestros estudios previos mostraron que la sobreexpresión de Rab18 en adipocitos 3T3-L1 provocó un aumento de la capacidad lipolítica de estas células (Pulido *et al.*, 2011). Estas observaciones, junto con la posible interacción de Rab18 con LRBA encontrada en este estudio, sugieren que esta GTPasa podría actuar en coordinación con LRBA, facilitando así la acción de PKA sobre el proceso lipolítico.

Por otra parte, y continuando con la acción de la insulina en adipocitos, se ha demostrado recientemente que la actividad de PTEN está aumentada en el tejido adiposo de pacientes con resistencia a insulina (Hodakoski *et al.*, 2014). En estas condiciones, el incremento observado en los niveles de Rab18 en el tejido adiposo de pacientes obesos (Pulido *et al.*, 2011), resulta paradójico. Es importante destacar que la actividad de PTEN está regulada por un gran número de factores (i.e., PPAR γ , p53, peroxirredoxina 1, etc) (Song *et al.*, 2012), por lo que el posible efecto inhibitorio de Rab18 podría verse enmascarado en esas condiciones. Alternativamente, a pesar del aumento cuantitativo en Rab18 observado en obesidad, la GTPasa puede no ser funcional en dichas condiciones, como se discute más adelante.

Nuestros estudios proteómicos sobre LDs permitieron identificar GDI2 en la superficie de las gotas de células estimuladas con insulina. Aunque en este estudio no hemos demostrado una interacción directa de Rab18 con esta proteína, es muy probable que esta interacción exista, ya que se conoce que GDI2 es una proteína ubicua reguladora de la actividad de proteínas GTPasas de la familia Rab (Nishimura *et al.*, 1994; Nishimura *et al.*, 1995; Alory y Balch, 2001). Específicamente, las proteínas Rab son secuestradas por proteínas GDI que presentan gran afinidad por las Rab inactivas unidas a GDP, impidiendo el intercambio de GDP por GTP y, por tanto, reteniéndolas en su conformación inactiva (Stenmark, 2009). En el presente estudio hemos descubierto que la sobreexpresión de GDI2 disminuye la cantidad de Rab18 endógena asociada a las LDs en adipocitos tratados con insulina, así como la exógena (datos no mostrados), lo que está de acuerdo con el papel propuesto para GDI2 sobre las proteínas Rab (Gavriljuk *et al.*, 2013). Más aún, la sobreexpresión de GDI2 provocó una disminución tanto en la actividad lipogénica como en la lipolítica de adipocitos 3T3-L1, aunque este último efecto fue más débil. Estos datos apoyan la idea de que GDI2 actúa como un regulador negativo de la actividad de Rab18 en adipocitos y, por tanto, GDI2 puede representar un componente más de la maquinaria molecular responsable del mantenimiento de la homeostasis lipídica en adipocitos. Aunque se conoce que GDI2 no es específica para una única proteína Rab, sino que presenta

afinidad por varios miembros de esta familia, (Rab1, Rab2, Rab6, Rab11, Rab35, etc) (Janoueix-Lerosey *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1998; Gavriljuk *et al.*, 2013), teniendo en cuenta nuestros resultados sobre Rab18, es razonable proponer que el efecto negativo de la sobreexpresión de GDI2 sobre el metabolismo lipídico puede ser debido, al menos en parte, a la acción negativa de esta enzima sobre Rab18. Es importante resaltar que estudios recientes de nuestro laboratorio de proteómica comparativa de tejido adiposo visceral de pacientes delgados y obesos con distinta sensibilidad a insulina, nos han permitido identificar que la cantidad de GDI2 presente en este tejido es significativamente mayor en individuos obesos que en delgados y, en los obesos, la expresión es mayor en aquellos que presentan resistencia a insulina respecto a individuos con índice de masa corporal comparable pero con niveles normales de glucosa, insulina y HOMA-IR (i.e., normoglucémicos) (datos no publicados). Estos datos sugieren que, aunque los adipocitos de pacientes obesos puedan contener una mayor cantidad de Rab18, ésta podría estar fundamentalmente en un estado inactivo, especialmente en condiciones de resistencia a insulina. Esto estaría también de acuerdo con la mayor actividad de PTEN observada por otros autores en el tejido adiposo de estos pacientes (Hodakoski *et al.*, 2014).

Regulación de Rab18 en respuesta a estímulos inflamatorios - Obesidad

A lo largo de esta discusión, se ha mencionado en numerosas ocasiones el incremento de la expresión de Rab18 en condiciones de obesidad que han mostrado nuestros estudios previos sobre tejido adiposo procedente de diversos modelos murinos de obesidad tanto genética como inducida por dieta, así como en tejido adiposo humano de pacientes con distinto grado de obesidad y/o sensibilidad a insulina. La obesidad se define como un estado crónico de baja inflamación caracterizado por la presencia, entre otros factores, de la citoquina proinflamatoria TNF α , considerada como un mediador importante del proceso inflamatorio. De hecho, estudios del nivel de TNF α en individuos delgados y obesos con diferente grado de sensibilidad a insulina, han descrito el incremento en la expresión de esta citoquina en paralelo con la expansión del tejido adiposo, aunque no se haya manifestado resistencia a insulina (Barbarroja *et al.*, 2010), si bien, los individuos que presentan resistencia a insulina mostraron niveles aún más elevados con respecto a los obesos no insulino resistentes. Por ello, analizamos el efecto de esta citoquina sobre la distribución subcelular de Rab18, eligiendo en particular las condiciones en las que esta GTPasa se encuentra más asociada a la superficie de las LDs, la privación de

suelo. De forma interesante, esta citoquina provocó la disociación de Rab18 de la superficie de las LDs al cabo de 8 h, siendo este efecto mucho más patente a las 24 h. Adicionalmente, los niveles de expresión de Rab18 no se mostraron alterados en presencia de TNF α , lo que sugiere que el ambiente proinflamatorio generado por esta citoquina, podría actuar sobre la actividad de esta GTPasa. Estos resultados, junto con nuestras observaciones previas del incremento de GDI2 en obesidad y resistencia a insulina, sugieren que, a pesar de haber un incremento en la expresión de Rab18 en condiciones de obesidad, esta GTPasa podría no ser funcional. Estas observaciones a su vez estarían en consonancia con el incremento de la actividad de PTEN en estos individuos (Hodakoski *et al.*, 2014).

Así, el conjunto de estos resultados, apoya la propuesta de un estado funcionalmente inactivo de Rab18 en condiciones de obesidad, lo que sugiere que la disfunción de esta GTPasa podría jugar un papel en la obesidad.

En resumen, nuestros estudios han permitido identificar nuevos reguladores y efectores que median la acción de Rab18 sobre la regulación de la homeostasis de las gotas lipídicas en respuesta a las principales señales que controlan la función de los adipocitos, poniendo en evidencia un posible papel de esta GTPasa como mediador en la interacción funcional de los orgánulos celulares implicados en la traducción de dichas señales (LDs, RE, mitocondrias y peroxisomas), para permitir una respuesta celular coordinada y adaptada a las mismas.

CONCLUSIONES

1. Rab18 es un componente fundamental de la cubierta proteica de las gotas lipídicas en los adipocitos, en los que actuaría como un mediador común en la traducción y adaptación de la respuesta de estas células frente a condiciones de exceso (insulina) o de deficiencia (estimulación β -adrenérgica y/o deprivación de nutrientes) energética. La alteración de la función de Rab18 que ocurre en condiciones de inflamación podría contribuir a la disfunción del tejido adiposo asociada a la obesidad.
2. Rab18 podría incorporarse a la superficie de las gotas lipídicas mediante difusión lateral desde las membranas del retículo endoplásmico, en un proceso que no parece depender de la red del citoesqueleto.
3. Bajo condiciones de inducción de lipogénesis, Rab18 podría facilitar la incorporación de TAGs a las gotas lipídicas mediante su interacción con la enzima lipogénica LPPR3 en dominios del retículo endoplásmico enriquecidos en DGAT2. Adicionalmente, Rab18 podría favorecer la acción lipogénica de la insulina mediante su interacción con el sistema MAST3/PTEN.
4. Rab18 podría desempeñar un papel general en el posicionamiento de las gotas lipídicas respecto a los orgánulos relacionados con la regulación del metabolismo lipídico (retículo endoplásmico, mitocondrias y peroxisomas), con el fin de acoplar la remodelación de las LDs (i.e., incorporación y/o movilización de TAGs y de otros lípidos complejos) a otros procesos celulares que tienen lugar en dichos orgánulos.

CONCLUSIONS

1. Rab18 is a key component of the protein coat that surrounds lipid droplets, wherein it could act as a mediator in the transduction and adaptive response of these cells to conditions of energy excess (insulin) or deficiency (β -adrenergic stimulation and/or serum deprivation). Alterations in Rab18 function that occurs in inflammatory conditions might contribute to the dysfunction of the adipose tissue associated to obesity.
2. Rab18 could translocate to the lipid droplet surface by lateral diffusion from endoplasmic reticulum membranes, in a process that does not appear to depend on the cellular cytoskeleton.
3. In a lipogenic state, Rab18 could facilitate triglyceride incorporation into lipid droplets by its interaction with the lipogenic enzyme LPPR3 in specialized endoplasmic reticulum subdomains enriched in DGAT2. Additionally, Rab18 could favor lipogenic action of insulin by its direct interaction with the MAST3/PTEN system.
4. Rab18 could play a general role in the relative position of lipid droplets in relation with other organelles involved in the regulation of lipid metabolism (endoplasmic reticulum, mitochondria and peroxisomes), in order to couple lipid droplet remodeling (i.e., incorporation and/or mobilization of TAGs and other lipid forms) with other cellular processes taking place in these organelles.

BIBLIOGRAFÍA

- Aherne, W. y Hull, D.** (1966). "Brown adipose tissue and heat production in the newborn infant". *J. Pathol. Bacteriol.* 91: 223-234.
- Ahima, R.S. y Lazar, M.A.** (2008). "Adipokines and the peripheral and neural control of energy balance". *Mol. Endocrinol.* 22: 1023-1031.
- Aivazian, D., Serrano, R.L. y Pfeffer, S.** (2006). "TIP47 is a key effector for Rab9 localization". *J. Cell Biol.* 173: 917-926.
- Alexander, G. y Bell, A.W.** (1975). "Quantity and calculated oxygen consumption during summit metabolism of brown adipose tissue in newborn lambs". *Biol. Neonate.* 26: 214-220.
- Alexandrov, K., Horiuchi, H., Steele-Mortimer, O., Seabra, M.C. y Zerial, M.** (1994). "Rab escort protein-1 is a multifunctional protein that accompanies newly prenylated rab proteins to their target membranes". *EMBO J.* 13: 5262-5273.
- Ali, B.R., Wasmeier, C., Lamoreux, L., Strom, M. y Seabra, M.C.** (2004). "Multiple regions contribute to membrane targeting of Rab GTPases". *J. Cell Sci.* 117: 6401-6412.
- Alory, C. y Balch W.E.** (2001). "Organization of the Rab-GDI/CHM superfamily: the functional basis for choroideremia disease". *Traffic.* 2: 532-543.
- Alto, N.M., Soderling, J. y Scott, J.D.** (2002). "Rab32 in an A-kinase anchoring protein and participates in mitochondrial dynamics". *J. Cell Biol.* 154: 659-668
- Anand, P., Cermelli, S., Li, Z., Kassan, A., Bosch, M., Sigua, R., Huang, L., Oullette, A.J., Welte, M.A. y Gross, S.P.** (2012). "A novel role for lipid droplets in the organismal antibacterial response". *eLife.* 1: e00003.
- Andersson, L., Boström, P., Ericson, J., Rutberg, M., Magnusson, B., Marchesan, D., Ruiz, M., Asp, L., Huang, P., Frohman, M.A., Borén, J. y Olofsson, S.O.** (2006). "PLD1 and ERK2 regulate cytosolic lipid droplet formation". *J. Cell Sci.* 119: 2246-2257.
- Andreani, J. y Guerois, R.** (2014). "Evolution of protein interactions: From interactomes to interfaces". *Arch. Biochem. Biophys.* En prensa.
- Andres, D.A., Seabra, M.C., Brown, M.S., Armstrong, S.A., Smeland, T.E., Cremers, F.P. y Goldstein J.L.** (1993). "cDNA cloning of component A of Rab geranylgeranyl transferase and demonstration of its role as a Rab escort protein". *Cell.* 73: 1091-1099.
- Angers, C.G. y Merz, A.J.** (2011). "New links between vesicle coats and Rab-mediated vesicle targeting". *Semin. Cell. Dev. Biol.* 22: 18-26.
- Ardail, D., Gasnier, F., Lermé, F., Simonot, C., Louisot, P. y Gateau-Roesch, O.** (1993). "Involvement of mitochondrial contact sites in the subcellular compartmentalization of phospholipid biosynthetic enzymes". *J. Biol. Chem.* 268: 25985-25992.
- Ariotti, N., Murphy, S., Hamilton, N.A., Wu, L., Green, K., Schieber, N.L., Li, P., Martin, S. y Parton, R.G.** (2012). "Postlipolytic insulin-dependent remodeling of micro lipid droplets in adipocytes". *Mol. Biol. Cell.* 23: 1826-1837.

Bahadoran, P., Aberdam, E., Mantoux, F., Busca, R., Bille, K., Yalman, N., de Saint-Basile, G., Casaroli-Marano, R., Ortonne, J.P. y Ballotti, R. (2001). "Rab27a: A key to melanosome transport in human melanocytes". *J. Cell. Biol.* 152: 843-850.

Balistreri, C.R., Caruso, C. y Candore, G. (2010). "The Role of Adipose Tissue and Adipokines in Obesity related Inflammatory Diseases". *Mediators. Inflamm.* 10: 802078.

Barbe, P., Millet, L., Galitzky, J., Lafontan, M. y Berlan, M. (1996). "In situ assessment of the role of the beta 1-, 2- and beta 3-adrenoceptors in the control of lipolysis and nutritive blood flow in human subcutaneous adipose tissue". *Br. J. Pharmacol.* 117: 907-913.

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

Barata, J.T. (2011). "The impact of PTEN regulation by CK2 on PI3K-dependent signaling and leukemia cell survival". *Adv. Enzyme Regul.* 51: 37-49.

Barr F. y Lambright D.G. (2010). "Rab GEFs and GAPs". *Curr. Opin. Cell. Biol.* 22: 461-470.

Bartz, R., Li, W.H., Venables, B., Zehmer, J.K., Roth, M.R., Welti, R., Anderson, R.G., Liu, P. y Chapman, K.D. (2007). "Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic". *J. Lipid. Res.* 48: 837-847.

Beilstein, F., Bouchoux, J., Rousset, M. y Demignot, S. (2013). "Proteomic analysis of lipid droplets from Caco-2/TC7: Enterocytes identifies novel modulators of lipid secretion". *PLOS One.* 8: e53017.

Beller, M., Riedel, D., Jansch, L., Dieterich, G., Wehland, J., Jäckle, H. y Kühnlein, R.P. (2006) "Characterization of the Drosophila lipid droplet subproteome". *Mol. Cell. Proteomics.* 5: 1082-109.

Beller, M., Sztalryd, C., Southall, N., Bell, M., Jäckle, H., Auld, D.S. y Oliver, B. (2008). "COPI Complex is a regulator of Lipid Homeostasis". *PLOS Biol.* 6: e292.

Beller, M., Thiel, K., Thul, P.J. y Jäckle, H. (2010). "Lipid droplets: A dynamic organelle moves into focus". *FEBS Letters.* 584: 2176-2182.

Ben Rached, F., Ndjembo-Ezougou, C., Chandran, S., Talabani, H., Yera, H., Dandavate, V., Bourdoncle, P., Meissner, M., Tatu, U. y Langsley, G. (2012). "Construction of a Plasmodium falciparum Rab-interactome identifies CK1 and PKA as Rab-effector kinases in malaria parasites". *Biol. Cell.* 104: 34-47.

Bellot, A., Guivernau, B., Tajés, M., Bosch-Morató, M., Valls-Comamala, V. y Muñoz, F.J. (2014). "The structure and function of actin cytoskeleton in mature glutamatergic dendritic spines". *Brain. Res.* En prensa.

Berggreen, C., Gormand, A., Omar, B., Degerman, E. y Goransson, O. (2009). "Protein kinase B activity is required for the effects of insulin on lipid metabolism in adipocytes". *Am. J. Physiol. Endocrinol.* 296: E635-646.

- Bevan, P.** (2001). "Insulin signaling". *J. Cell Sci.* 114: 1429-1430.
- Binns, D., Januszewski, T., Chen, Y., Hill, J., Markin, V.S., Zhao, Y., Gilpin, C., Chapman, K.D., Anderson, R.G. y Goodman, J.M.** (2006). "An intimate collaboration between peroxisomes and lipid bodies". *J. Cell Biol.* 173: 719-731.
- Bjorntorp, P.** (1974). "Effects of age, sex, and clinical conditions on adipose tissue cellularity in man". *Metabolism.* 23: 1091-1102.
- Blanchette-Mackie, E.J., y Scow, R.O.** (1983). "Movement of lipolytic products to mitochondria in brown adipose tissue of young rats: an electron microscope study". *J. Lipid Res.* 24: 229-244.
- Blanchette-Mackie, E.J., Dwyer, N.K., Barber, T., Coxey, R.A., Takeda, T., Rondinone, C.M., Theodorakis, J.L., Greenberg, A.S. y Londos, C.** (1995). "Periplin is located on the surface layer of intracellular lipid droplets in adipocytes". *J. Lipid Res.* 36: 1211-1226.
- Bloor, I.D. y Symonds, M.E.** (2014). "Sexual dimorphism in white and brown adipose tissue with obesity and inflammation". *Horm. Behav.* En prensa.
- Blouin, C.M., Le Lay, S., Eberl, A., Kofeler, H.C., Guerrera, I.C., Klein, C., Le Liepvre, X., Lasnier, F., Bourron, O., Gautier, J.F., Ferre, P., Hajdouch, E. y Dugail, I.** (2010). "Lipid droplet analysis in caveolin-deficient adipocytes: alterations in surface phospholipid composition and maturation defects". *J. Lipid. Res.* 51: 945-956.
- Blümer, J., Rey, J., Dehmelt, L., Mazel, T., Wu, Y.W., Bastiens, P., Goody, R.S. y Itzen, A.** (2013). "RabGEFs are a major determinant for specific Rab membrane targeting". *J. Cell. Biol.* 200: 287-300.
- Boden, G.** (2001). "Free fatty acids-the link between obesity and insulin resistance". *Endocr. Pract.* 7: 44-51.
- Bogacka, I., Xie, H., Bray, G.A. y Smith, S.R.** (2005). "Pioglitazone induces mitochondrial biogenesis in human subcutaneous adipose tissue in vivo". *Diabetes.* 54: 1392-1399.
- Bordicchia, M., Liu, D. and Amri, E.Z., Ailhaud, G., Dessì-Fulgheri, P., Zhang, C., Takahashi, N., Sarzani, R. y Collins, S.** (2012). "Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes". *J. Clin. Invest.* 122: 1022-1036.
- Boström, P., Andersson, L., Rutberg, M., Perman, J., Lidberg, U., Johansson, B.R., Fernandez-Rodriguez, J., Ericson, J., Nilsson, T., Boren, J. y Olofsson, S.O.** (2007). "SNARE proteins mediate fusion between cytosolic lipid droplets and are implicated in insulin sensitivity". *Nat. Cell Biol.* 9: 1286-1293.
- Boström, P., Rutberg, M., Ericsson, J., Holmdahl, P., Andersson, L., Frogman, M.A., Borén, J. y Olofsson, S.O.** (2005). "Cytosolic lipid droplets increase in size by microtubule-dependent complex formation". *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25: 1945-1951.
- Boura-Halfon, S. y Zick, Y.** (2009). "Phosphorylation of IRS proteins, insulin action and insulin resistance". *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296: E581-591.

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

Brasaemle, D.L., Barber, T., Wolins, N.E., Serrero, G., Blancette-Mackie, E.J. y Londos, C. (1997). "Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein". *J. Lipid Res.* 38: 2249-2263.

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

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

Brasaemle, D.L. (2007). "The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis". *J. Lipid Res.* 48: 2547-2559.

Brasaemle, D.L. y Wolins, N.E. (2012). "Packaging of fat: an evolving model of lipid droplet assembly and expansion". *J. Biol. Chem.* 287: 2273-2279.

Bräuer, A.U., Savaskan, N.E., Kühn, H., Prehn, S., Ninnemann, O. y Nitsch, R. (2003). "A new phospholipid phosphatase, PRG-1, is involved in axon growth and regenerative sprouting". *Nat. Neurosci.* 6: 572-578.

Braveman, N.E. y Moser, A.B. (2012). "Functions of plasmalogen lipids in health and disease". *Biochim. Biophys. Acta.* 1822: 1442-1452.

Brites, P., Waterham, H.R. y Wanders, R.J. (2004). "Functions and biosynthesis of plasmalogens in health and disease". *Biochim. Biophys. Acta* 1636: 219-231.

Bruce, K.D. y Hanson, M.A. (2010). "The developmental origins, mechanisms and implications of metabolic syndrome". *J. Nutr.* 140: 648-652.

Bucci, C. y Chiarello, M. (2006). "Signal transduction gRABs attention". *Cell. Sign.* 18: 1-8

Buhman, K.K., Chen, H.C. y Farese, R.V.Jr. (2001). "The enzymes of neutral lipid synthesis". *J. Biol. Chem.* 276: 40369-40372.

Burguete, A.S., Fenn, T.D., Brunger, A.T. y Pfeffer, S. R. (2008). "Rab and Arl GTPase family members cooperate in the localization of the golgin GCC185". *Cell* 132: 286-298.

Cabré, A., Lázaro, I., Girona, J., Manzanares, J.M., Marimón, F., Plana, N., Heras, M. y Masana, L. (2007). "Fatty acid binding protein 4 is increased in metabolic síndrome and with thiazolidinedione treatment in diabetic patients". *Atherosclerosis.* 195: E150-158.

Calero M. y Collins R.N. (2002). "Saccharomyces cerevisiae Pra1p/Yip3p interacts with Yip1p and Rab proteins". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290: 676-681.

- Calero M., Winand N.J. y Collins R.N.** (2002). "Identification of the novel proteins Yip4p and Yip5p as Rab GTPase interacting factors". *FEBS Lett.* 515: 89-98.
- Camacho, L., Smertenko, A.P., Pérez-Gómez, J., Hussey, P.J. y Moore, I.** (2009). "Arabidopsis Rab-E GTPases exhibit a novel interaction with a plasma-membrane phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase". *J. Cell. Sci.* 122: 4383-4392
- Carroll, K.S., Hanna, J., Simon, I., Krise, J., Barbero, P. y Pfeffer, S.R.** (2001). "Role of Rab9 GTPase in facilitating receptor recruitment by TIP47". *Science.* 292: 1373-1376.
- Cases, S., Smith, S.J., Zheng, Y.W., Myers, H.M., Lear, S.R., Sande, E., Novak, S., Collins, C., Welch, C.B., Lusis, A.J., Erickson, S.K. y Farese, R.V.Jr.** (1998). "Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 13018-13023.
- Caviglia, J.M., De Gomez Dumm, I.N., Coleman, R.A. y Igal, R.A.** (2004). "Phosphatidylcholine deficiency upregulates enzymes of triacylglycerol metabolism in CHO cells". *J. Lipid. Res.* 45: 1500-1509.
- Cermelli, S., Guo, Y., Gross, S.P. y Welte, M.A.** (2006). "The lipid-droplet proteome reveals that droplets are a protein-storage depot". *Curr. Biol.* 16: 1783-1795.
- Chakrabarti, P., English, T., Shi, J., Smas, C.M. y Kandrór, K.V.** (2010). "Mammalian target of rapamycin complex 1 suppresses lipolysis, stimulates lipogenesis, and promotes fat storage". *Diabetes.* 59: 775-781.
- Chavez, J.A. y Summers, S.A.** (2010). "Lipid oversupply, selective insulin resistance, and lipotoxicity: molecular mechanisms". *Biochim. Biophys. Acta.* 1801: 252-265.
- Chavrier, P., Gorvel, J.P., Stelzer, E., Simons, K., Gruenberg, J. y Zerial, M.** (1991). "Hypervariable C-terminal domain of rab proteins acts as a targeting signal". *Nature* 353: 769-772.
- Cheng, J., Fujita, A., Ohsaki, Y., Suzuki, M., Shinohara, Y. y Fujimoto, T.** (2009). "Quantitative electron microscopy shows uniform incorporation of triglycerides into existing lipid droplets". *Histochem. Cell Biol.* 132: 281-291.
- Chinni, S.R., Brenz, M. y Shisheva, A.** (1998). "Modulation of GDP-dissociation inhibitor protein membrane retention by the cellular redox state in adipocytes". *Exp. Cell. Res.* 242: 373-380.
- Chitraju, C., Trotsmuller, M., Hartler, J., Wolinski, H., Thallinger, G.G., Lass, A., Zechner, R., Zimmermann, R., Kofeler, H.C. y Spener, F.** (2012). "Lipidomic analysis of lipid droplets from murine hepatocytes reveals distinct signatures for nutritional stress". *J. Lipid. Res.* 53: 2141-2152.
- Choi, D.K., Oh, T.S., Choi, J.W., Mukherjee, R., Wang, X., Liu, H. y Yun, J.W.** (2011). "Gender difference in proteome of brown adipose tissues between male and female rats exposed to a high fat diet". *Cell Physiol. Biochem.* 28: 933-948.

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

Clague, M.J. y Urbé, S. (2001). "The interface of receptor trafficking and signaling". *J. Cell. Sci.* 114: 3075-3081.

Clarke, L., Heasman, L., Firth, K. y Symonds, M.E. (1997). "Influence of route of delivery and ambient temperature on thermoregulation in newborn lambs". *Am. J. Physiol.* 272: R1931-1939.

Cohen, A.W., Razani, B., Schubert, W., Williams, T.M., Wang, X.B., Iyengar, P., Brasaemle, D.L., Scherer, P.E. y Lisanti, M.P. (2004). "Role of Caveolin-1 in the Modulation of Lypolysis and Lipid droplet formation". *Diabetes.* 53: 1261-1270.

Colicelli J. (2004). "Human RAS superfamily proteins and related GTPases". *Sci STKE.* 2004: RE13.

Combs, T.P., Berg, A.H., Obici, S., Scherer, P.E. y Rossetti, L. (2001). "Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30". *J. Clin. Invest.* 108: 1875-1881.

Cui, Z., Vance, J.E., Chen, M.H., Voelker, D.R. y Vance, D.E. (1993). "Cloning and expression of a novel phosphatidylethanolamine N-methyltransferase. A specific biochemical and cytological marker for a unique membrane fraction in rat liver". *J. Biol. Chem.* 268: 16655-16663.

Cypess, A.M. y Kahn, C.R. (2010) "Brown fat as a therapy for obesity and diabetes". *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 17: 143-149.

Czech, M.P., Tencerova, M., Pedersen, D.J. y Aouadi, M. (2013). "Insulin signaling mechanisms for triacylglycerol storage". *Diabetologia.* 56: 949-964.

D'Autréaux, B. y Toledano, M.B. (2007) "ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis". *Nature.* 8: 813-824

De Antoni, A., Schmitzova, J., Trepte, H.H., Gallwitz, D. y Albert, S. (2002). "Significance of GTP hydrolysis in Ypt1p-regulated endoplasmic reticulum to Golgi transport revealed by the analysis of two novel Ypt1-GAPs". *J. Biol. Chem.* 277: 41023- 41031.

Dejgaard, S.Y., Murshid, A., Erman, A., Kizilay, O., Verbich, D., Lodge, R., Dejgaard, K., Ly-Hartig, T.B., Pepperkok, R., Simpson, J.C. y Presley, J.F. (2008). "Rab18 and Rab43 have key roles in ER-Golgi trafficking". *J. Cell. Sci.* 121: 2768-2781.

Dejgaard, S.Y., Murshid, A., Erman, A., Kizilay, O., Verbich, D., Lodge, R., Dejgaard, K., Ly-Hartig, T.B., Pepperkok, R., Simpson, J.C. y Presley, J. F. (2008). "Rab18 and Rab43 have key roles in ER-Golgi trafficking". *J. Cell Sci.* 121: 2768-2781.

DeLong, C.J., Shen, Y.J., Thomas, M.J. y Cui, Z. (1999). "Molecular distinction of phosphatidylcholine synthesis between the CDP-choline pathway and phosphatidylethanolamine methylation pathway". *J. Biol. Chem.* 274: 29683-29688.

- Dentin, R., Girard, J. and Postic, C.** (2005). "Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver". *Biochimie*. 87: 81-86.
- Digel, M., Eehalt, R. y Fullekrug, J.** (2010). "Lipid droplets lighting up: insights from live microscopy". *FEBS Lett*. 584: 2168-2175.
- Ding, Y., Wu, Y., Zeng, R. y Liao, K.** (2012). "Proteomic profiling of lipid droplet-associated proteins in primary adipocytes of normal and obese mouse". *Acta. Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. 44: 1-13.
- Du, L.L. y Novick, P.** (2001). "Yeast Rab GTPase-activating protein Gyp1p localizes to the Golgi apparatus and is a negative regulator of Ypt1p". *Mol. Biol. Cell*. 12: 1215-1226.
- Ducharme, N.A. y Bickel, P.E.** (2008). "Lipid droplets in lipogenesis and lipolysis". *Endocrinology*. 149: 942-949.
- Ducluzeau, P.H., Priou, M., Weitheimer, M., Flamment, M., Duluc, L., Iacobazi, F., Soleti, R., Simard, G., Durand, A., Rieusset, J., Andriantsitohaina, R. y Malthièry, Y.** (2011). "Dynamic regulation of mitochondrial network and oxidative functions during 3T3-L1 fat cell differentiation". *J. Physiol. Biochem*. 67: 285-296.
- Duncan, R.E., Ahmadian, M., Jaworski, K., Sarkadi-Nagy, E. y Sul, H.S.** (2007). "Regulation of Lipolysis in Adipocytes". *Annu. Rev. Nutr.* 27: 79-101.
- Duncan, R.E., Sarkadi-Nagy, E., Jaworski, K., Ahmadian, M. y Sul, H.S.** (2008). "Identification and functional characterization of adipose-specific phospholipase A2 AdPLA". *J. Biol. Chem*. 283: 25428-25436.
- Dvorak, A.M., Morgan, E.S. y Weller, P.F.** (2003). "RNA is closely associated with human mast cell lipid bodies". *Histol. Histopathol*. 18: 943-968.
- Echard, A., Jollivet, F., Martinez, O., Lacapere, J.J., Rousselet, A., Janoueix-Lerosey, I. y Goud B.** (1998). "Interaction of a Golgi-associated kinesin-like protein with Rab6". *Science*. 279: 580-585.
- Egan, J.J., Greenberg, A.S., Chang, M.K., Wek, S.A., Moos, M.C.Jr. y Londos, C.** (1992). "Mechanism of hormone-stimulated lipolysis in adipocytes: translocation of hormone-sensitive lipase to the lipid storage droplet". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89: 8537-8541.
- Eehalt, R., Fullekrug, J., Pohl, J., Ring, A., Herrmann, T. y Stremmel, W.** (2006). "Translocation of long chain fatty acids across the plasma membrane--lipid rafts and fatty acid transport proteins". *Mol. Cell. Biochem*. 284: 135-140.
- Eichmann, T.O., Kumari, M., Haas, J.T., Farese, R.V. Jr., Zimmermann, R., Lass, A. y Zechner, R.** (2012). "Studies on the substrate and stereo/regioselectivity of adipose triglyceride lipase, hormone-sensitive lipase, and diacylglycerol-O-acyltransferases". *J. Biol. Chem*. 287: 41446-41457.

Ellis, J.M., Frahm, J.L., Li, L.O. y Coleman, R.A. (2010). "Acyl-coenzyme A synthetases in metabolic control". *Curr. Opin. Lipidol.* 21: 212-217.

Eriksson, H., Ridderstrale, M. and Degerman, E., Ekholm, D., Smith, C.J., Manganiello, V.C., Belfrage, P. y Tornqvist, H. (1995). "Evidence for the key role of the adipocyte cGMP-inhibited cAMP phosphodiesterase in the antilipolytic action of insulin". *Biochim. Biophys. Acta.* 1266: 101-107.

Esseltine, J.L. y Ferguson, S.S.G. (2013). "Regulation of G protein-coupled receptor trafficking and signaling by Rab GTPases". *Small GTPases.* 4: 132-135

Eyster, C.A., Duggins, Q.S. y Olson, A.L. (2005). "Expression of Constitutively Active Akt/Protein Kinase B Signals GLUT4 Translocation in the Absence of an Intact Actin Cytoskeleton". *J. Biol. Chem.* 280: 17978-17985.

Fain, J.N., Madan, A.K., Hiler, M.L., Cheema, P. y Bahouth, S.W. (2004). "Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans". *Endocrinology.* 145: 2273-2282.

Fang, D., Wang, H.Y., Altman, Y., Elly, C. y Liu, Y.C. (2001). "Cbl-b, a RING-type E3 ubiquitin ligase, targets phosphatidylinositol 3-Kinase for ubiquitination in T Cells". *J. Biol. Chem.* 16: 4872-4878.

Farnsworth, C.C., Seabra, M.C., Ericsson, L.H., Gelb, M.H. y Glomset, J.A. (1994). "Rab geranylgeranyl transferase catalyzes the geranylgeranylation of adjacent cysteine in the small GTPases Rab1A, Rab3A, and Rab5A". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 11963-11967.

Faust, J.E., Verma, A., Peng, C. y McNew, J.A. (2012). "An inventory of peroxisomal proteins and pathways in *Drosophila melanogaster*". *Traffic.* 13: 1378-1392.

Fei, W., Shui, G., Gaeta, B., Du, X., Kuerschner, L., Li, P., Brown, A.J., Wenk, M.R., Parton, R.G. y Yang, H. (2008). "Fld1p, a functional homologue of human seipin, regulates the size of lipid droplets in yeast". *J. Cell Biol.* 180: 473-482.

Fei, W., Zhong, L., Ta, M.T., Shui, G., Wenk, M.R. y Yang, H. (2011). "The size and phospholipid composition of lipid droplets can influence their proteome". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 415: 455-462.

Feng, T., Szabo, E., Dziak, E. y Opas, M. (2010). "Cytoskeletal disassembly and cell rounding promotes adipogenesis from ES cells". *Stem. Cell Rev.* 6: 74-85.

Fève, B. (2005). "Adipogenesis: cellular and molecular aspects". *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 19: 483-499.

Franckhauser, S., Munoz, S., Pujol, A., Casellas, A., Riu, E., Otaegui, P., Su, B. y Bosch, F. (2002). "Increased fatty acid re-esterification by PEPCK overexpression in adipose tissue leads to obesity without insulin resistance". *Diabetes.* 51: 624-630.

- Frayn, K.N.** (1998). "Regulation of fatty acid delivery in vivo". *Adv. Exp. Med. Biol.* 441: 171-179.
- Frayn, K.N.** (2001). "Adipose tissue and the insulin resistance syndrome". *Proc. Nutr. Soc.* 60: 375-380.
- Frayn, K.N., Karpe, F., Fielding, B.A., Macdonald, I.A. y Coppack, S.W.** (2003). "Integrative physiology of human adipose tissue". *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 27: 875-888.
- Fredrikson, G., Tornqvist, H. y Belfrage, P.** (1986). "Hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase are both required for complete degradation of adipocyte triacylglycerol". *Biochim. Biophys. Acta.* 876: 288-93.
- Frühbeck, G., López, M. y Diéguez, C.** (2007). "Role of caveolins in body weight and insulin resistance regulation". *Trends Endocrinol. Metab.* 18: 177-182.
- Fujimoto, Y., Itabe, H., Sakai, J., Makita, M., Noda, J., Mori, M., Higashi, Y., Kojima, S. y Takano, T.** (2004). "Identification of major proteins in the lipid droplet-enriched fraction isolated from the human hepatocyte cell line HuH7". *Biochim. Biophys. Acta.* 1644: 47-59.
- Fujimoto, T. y Ohsaki, Y.** (2006). "Cytoplasmic lipid droplets: rediscovery of an old structure as a unique platform". *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1086: 104-115.
- Fujimoto, T., Ohsaki, Y., Cheng, J., Suzuki, M. y Shinohara, Y.** (2008). "Lipid droplets: a classic organelle with new outfits". *Histochem. Cell Biol.* 130: 263-279.
- Fujimoto, T. y Parton, R.G.** (2011). "Not just fat: the structure and function of the lipid droplet". *Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol.* 3: a004838.
- Fujishiro, M., Gotoh, Y., Katagiri, H., Sakoda, H., Ogihara, T., Anai, M., Onishi, Y., Ono, H., Abe, M., Shojima, N., Fukushima, Y., Kikuchi, M., Oka, Y. y Asano, T.** (2003). "Three mitogen-activated protein kinases inhibit insulin signaling by different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes". *Mol. Endocrinol.* 17: 487-497.
- Fujiwara, T., Oda, K., Yokota, S., Takatsuki, A. y Ikenhara, Y.** (1988). "Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum". *J. Biol. Chem.* 263: 18545-18552.
- Furuhashi, M. y Hotamisligil, G.S.** (2008). "Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets". *Nat. Rev. Drug. Discov.* 7: 489-503.
- Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M. y Shimomura, I.** (2004). "Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome". *J. Clin. Invest.* 114: 1752-1761.
- Gaigg, B., Simbeni, R., Hrastnik, C., Paltauf, F. y Daum, G.** (1995). "Characterization of a microsomal subfraction associated with mitochondria of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Involvement in synthesis and import of phospholipids into mitochondria". *Biochim. Biophys. Acta.* 1234: 214-220.

- Gao, T., Furnari, F. y Newton, A.C.** (2005). "PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth". *Mol. Cell.* 18: 13-24.
- Garland, P., Quraishe, S., Frenc, P. y O'Connor, V.** (2008). "Expression of the MAST family of serine/threonine kinases". *Brain Res.* 1195: 12-19.
- Gasic, S., Tian, B. y Green, A.** (1999). "Tumor necrosis factor alpha stimulates lipolysis in adipocytes by decreasing Gi protein concentrations". *J. Biol. Chem.* 274: 6770-6775.
- Gerondopoulos, A., Langemeyer, L., Liang, J.R., Linford, A. y Barr, F.A.** (2012). "BLOC-3 mutated in Hermansky-Pudlak syndrome is a Rab32/38 guanine nucleotide exchange factor". *Curr. Biol.* 22: 2135-2139.
- Gerondopoulos, A., Bastos, R.N., Yoshimura, S.I., Anderson, R., Carpanini, S., Aligianis, I., Handley, M.T. y Barr, F.A.** (2014). "Rab18 and a Rab18 GEF complex are required for normal RE structure". *J. Cell. Biol.* En prensa.
- Ghorbani, M., Claus, T.H. y Himms-Hagen, J.** (1997). "Hypertrophy of brown adipocytes in brown and white adipose tissues and reversal of diet-induced obesity in rats treated with a beta3-adrenoceptor agonist". *Biochem. Pharmacol.* 54: 121-131.
- Gidda, S.K., Shockey, J.M., Falcone, M., Kim, P.K., Rothstein, S.J., Andrews, D.W., Dyer, J.M. y Mullen, R.T.** (2011). "Hydrophobic-Domain-Dependent Protein-Protein Interactions Mediate the Localization of GPAT Enzymes to ER Subdomains". *Traffic.* 12: 452-472.
- Glatz, J.F., Börchers, T., Spener, F. y van der Vusse, G.J.** (1995). "Fatty acids in cell signaling: modulation by lipid binding proteins". *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 52: 121-127.
- Goetzl, E.J., Goldman, D.W., Naccache, C.H., Sha'afi, Ri. y Pickett, W.C.** (1982). "Mediation of leukocyte components of inflammatory reactions by lipooxygenase products of arachidonic acid". *Adv. Prostaglandin. Thromboxane. Leukot. Res.* 9: 273-282.
- Gong, J., Sun, Z., Wu, L., Xu, W., Schieber, N., Xu, D., Shui, G., Yang, H., Parton, R.G. y Li, P.** (2011). "Fsp27 promotes lipid droplet growth by lipid exchange and transfer at lipid droplet contact sites". *J. Cell Biol.* 195: 953-963.
- Goodman, J.M.** (2008). "The gregarious lipid droplet". *J. Biol. Chem.* 283: 28005-28009.
- Goody, R.S., Rak, A. y Alexandrov, K.** (2005). "The structural and mechanistic basis for recycling of Rab proteins between membrane compartments". *Cell. Mol. Life. Sci.* 62: 1657-1670.
- Grahn, T.H., Kaur, R., Yin, J., Schweiger, M., Sharma, V.M., Lee, M.J., Ido, Y., Smas, C.M., Zechner, R., Lass, A. y Puri, V.** (2014). "Fat-specific Protein 27 (FSP27) interacts with adipose triglyceride lipase (ATGL) to regulate lipolysis and insulin sensitivity in human adipocytes". *J. Biol. Chem.* 289: 12029-12039.
- Granata, R. y Ghigo, E.** (2013). "Products of the ghrelin gene, the pancreatic β -cell and the adipocyte". *Endocr. Dev.* 25: 144-156.

- Granger, E., McNee, G., Allan, V. y Woodman, P.** (2014). "The role of the cytoskeleton and molecular motors in endosomal dynamics". *Semin. Cell Dev. Biol.* En prensa.
- Granneman, J.G., Moore, H.P., Granneman, R.L., Greenberg, A.S., Obin, M.S. y Zhu, Z.** (2007). "Analysis of lipolytic protein trafficking and interactions in adipocytes". *J. Biol. Chem.* 282: 5726-5735.
- Greenberg, A.S., Coleman, R.A., Kraemer, F.B., McManaman, J.L., Obin, M.S., Puri, V., Yan, Q.W., Miyoshi, H. y Mashek, D.G.** (2011). "The role of lipid droplets in metabolic disease in rodents and humans". *J. Clin. Invest.* 121: 2102-2110.
- Gregor, M.F. y Hotamisligil, G.S.** (2007). "Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease". *J. Lipid. Res.* 48: 1905-1914.
- Grillitsch, K., Connerth, M., Kofeler, H., Arrey, T.N., Rietschel, B., Wagner, B., Karas, M. y Daum, G.** (2011). "Lipid particles/droplets of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* revisited: lipidome meets proteome". *Biochim. Biophys. Acta.* 1811: 1165-1176.
- Gross, S.P., Welte, M.A., Block, S.M. y Wieschaus, E.F.** (2000). "Dynein-mediated cargo transport in vivo. A switch control travel distance". *J. Cell Biol.* 148: 945-956.
- Grosshans, B.L., Ortiz, D. y Novick, P.** (2006). "Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103: 11821-11827.
- Gual, P., Le Marchand-Brustel, Y. y Tanti, J.F.** (2005). "Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation". *Biochimie.* 87: 99-109.
- Guerra, C., Koza, R.A., Yamashita, H., Walsh, K. y Kozak, L.P.** (1998). "Emergence of brown adipocytes in white fat in mice is under genetic control. Effects on body weight and adiposity". *J. Clin. Invest.* 102: 412-420.
- Guilherme, A., Virbasius, J.V., Puri, V. y Czech, M.P.** (2008). "Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes". *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 9: 367-377.
- Gubern, A., Casas, J., Barcelo-Torns, M., Bareda, D., de la Rosa, X., Masgrau, R., Picatoste, F., Balsinde, J., Balboa, M.A. y Claro, E.** (2008). "Group IVA phospholipase A2 is necessary for the biogenesis of lipid droplets". *J. Biol. Chem.* 283: 27369-27382.
- Guijas, C., Perez-Chacon, G., Astudillo, A.M., Rubio, J.M., Gil-de-Gomez, L., Balboa, M.A. y Balsinde, J.** (2012). "Simultaneous activation of p38 and JNK by arachidonic acid stimulates the cytosolic phospholipase a2-dependent synthesis of lipid droplets in human monocytes". *J. Lipid. Res.* 53: 2343-2454.
- Guo, Y., Walther, T.C., Rao, M., Stuurman, N., Goshima, G., Terayama, K., Wong, J.S., Vale, R.D., Walter, P. y Farese, R.V.** (2008). "Functional genomic screen reveals genes involved in lipid-droplet formation and utilization". *Nature.* 453: 657-661.
- Haas, A.K., Yoshimura, S., Stephens, D.J., Preisinger, C., Fuchs, E. y Barr, F.A.** (2007). "Analysis of GTPase-activating proteins: Rab1 and Rab43 are key Rabs required to maintain a functional Golgi complex in human cells". *J. Cell Sci.* 120: 2997-3010.

- Hajra, A.K., Larkins, L., Das, A.K., Hemati, N., Erickson, R.L. y MacDougald, O.A.** (2000). "Induction of the peroxisomal Glycerolipid-synthesizing enzymes during differentiation of 3T3-L1 Adipocytes". *J. Biol. Chem.* 275: 9441-9446.
- Hales, C.M., Vaerman, J.P. y Goldenring, J.R.** (2002). "Rab11 family interacting protein 2 associates with Myosin Vb and regulates plasma membrane recycling". *J. Biol. Chem.* 277: 50415-50421.
- Hamdy, O., Porramatikul, S. y Al-Ozairi, E.** (2006). "Metabolic obesity: the paradox between visceral and subcutaneous fat". *Curr. Diabetes. Rev.* 2: 367-373.
- Hammer, J.A., 3rd y Wu, X.S.** (2002). "Rabs grab motors: defining the connections between Rab GTPases and motor proteins". *Curr. Opin. Cell. Biol.* 14: 69-75.
- Hanada, K., Kumagai, K., Yasuda, S., Miura, Y., Kawano, M., Fukasawa, M. y Nishijima, M.** (2003). "Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide". *Nature.* 426: 803-809.
- Harman-Boehm, I., Bluher, M., Redel, H., Sion-Vardy, N., Ovadia, S., Avinoach, E., Shai, I., Klötting, N., Stumvoll, M., Bashan, N. y Rudich, A.** (2007). "Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity". *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92: 2240-2247.
- Harris, T.E. y Lawrence, J.C.Jr.** (2003). "mTOR signaling". *Sci. STKE.* 2003: re15.
- Harris, C.A., Haas, J.T., Streeper, R.S., Stone, S.J., Kumari, M., Yang, K., Han, X., Brownell, N., Gross, R.W., Zechner, R. y Farese, R.V.Jr.** (2011). "DGAT enzymes are required for triacylglycerol synthesis and lipid droplets in adipocytes". *J. Lipid. Res.* 52: 657-667.
- Hayashi, H. y Hara, M.J.** (1997). "1-alkenyl group of ethanolamine plasmalogen derives mainly from *De Novo*-Synthesized Fatty Alcohol within peroxisomes, but not extraperoxisomal Fatty Alcohol or fatty acid". *J. Biochem.* 121: 978-983.
- Hayes, G.L. Brown, F.C., Haas, A.K., Nottingham, R.M., Barr, F.A. y Pfeffer, S.R.** (2009). "Multiple Rab GTPase binding sites in GCC185 suggest a model for vesicle tethering at the trans-Golgi". *Mol. Biol. Cell.* 20: 209-217.
- Heid, H., Rickelt, S., Zimbelmann, R., Winter, S., Schumacher, H. y Dörflinger, Y.** (2013). "Lipid droplets, perilipins and cytokeratins: Unravelling Liaisons in Epithelium-derived cells". *PLOS One.* 8: e63061.
- Heid, H., Rickelt, S., Zimbelmann, R., Winter, S., Schumacher, H., Dörflinger, Y., Kuhn, C. y Franke, W.W.** (2014). "On the formation of lipid droplets in human adipocytes: The organization of the Perilipin-Vimentin Cortex". *PLOS One.* 9: e90386.
- Henegar, C., Tordjman, J., Achard, V., Lacasa, D., Cremer, I., Guerre-Millo, M., Poitou, C., Basdevant, A., Stich, V., Viguerie, N., Langin, D., Bedossa, P., Zucker, J.D. y Clemet, K.** (2008). "Adipose tissue transcriptomic signature highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity". *Genome Biol.* 9: R14.

- Hesse, D., Jaschke, A., Chung, B. y Schürmann, A.** (2013). "Trans-Golgi proteins participate in the control of lipid droplet and chylomicron formation". *Biosci. Rep.* 33: 1-9.
- Hodakoski, C., Hopkins, B.D., Barrows, D., Mense, S.M., Keniry, M., Anderson, K.E., Kern, P.A., Hawkins, P.T., Stephens, L.R. y Parsons, R.** (2014). "Regulation of PTEN inhibition by the pleckstrin homology domain of P-REX2 during insulin signaling and glucose homeostasis". 111: 155-160.
- Hodges, B.D.M. y Wu, C.C.** (2010). "Proteomic insights into an expanded cellular role for cytoplasmic lipid droplets". *J. Lipid Res.* 51: 262-273.
- Holthuis, J.C. y Levine, T.P.** (2005). "Lipid traffic: floppy drives and a superhighway." *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 209-220.
- Honsho, M., Yagita, Y., Kinoshita, N. y Fujiki, Y.** (2008). "Isolation and characterization of mutant animal cell line defective in alkyl-dihydroxyacetonephosphate synthase: localization and transport of plasmalogens to post-Golgi compartments". *Biochim. Biophys. Acta.* 1783: 1857-1865.
- Horgan, C.P. y McCaffrey, M.W.** (2011). "Rab GTPases and microtubule motors". *Biochem. Soc. Trans.* 39: 1202-1206.
- Horibata, Y. y Sugimoto, H.** (2010). "StarD7 mediates the intracellular trafficking of phosphatidylcholine to mitochondria". *J. Biol. Chem.* 285: 7358-7365.
- Horl, G., Wagner, A., Cole, L.K., Malli, R., Reicher, H., Kotzbeck, P., Kofeler, H., Hofler, G., Frank, S., Bogner-Strauss, J.G., Sattler, W., Vance, D.E. y Steyrer, E.** (2011). "Sequential synthesis and methylation of phosphatidylethanolamine promote lipid droplet biosynthesis and stability in tissue culture and in vivo". *J. Biol. Chem.* 286: 17338-17350.
- Hotamisligil, G.S., Murray, D.L., Choy, L.N. y Spiegelman, B.M.** (1993). "Tumor necrosis factor a inhibits signaling from the insulin receptor". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 4854-4858.
- Hresko, R.C. y Mueckler, M.** (2005). "mTOR-RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes". *J. Biol. Chem.* 280: 40406-40416.
- Hsieh, K., Lee, Y.K., Londos, C., Raaka, B.M., Dalen, K.T. y Kimmel, A.R.** (2012). "Perilipin family members preferentially sequester to either triacylglycerol-specific or cholesteryl-esterspecific intracellular lipid storage droplets". *J. Cell Sci.* 125: 4067-4076.
- Huang, J., Imamura, T. y Olefsky, J.M.** (2001). "Insulin can regulate GLUT4 internalization by signaling to Rab5 and the motor protein dynein". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 13084-13089.
- Huang, J. y Manning, B.D.** (2009). "A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes". *Biochem. Soc. Trans.* 37: 217-222.
- Hull, D. y Segall, M.M.** (1965). "Heat production in the new-born rabbit and the fat content of the brown adipose tissue". *J. Physiol.* 181: 468-477.

Hunt, M.C., Siponen, M.I. y Alexson, S.E.H. (2012). "The emerging of acyl-CoA thioesterases and acyltransferases in regulating peroxisomal lipid metabolism". *Biochim. Biophys. Acta.* 1822: 1397-1410.

Igal, R.A., Wang, P. y Coleman, R.A. (1987). "Triacsin C blocks de novo synthesis of glycerolipids and cholesterol esters but not recycling of fatty acid into phospholipid: evidence for functionally separate pools of acyl-CoA". *Biochem. J.* 324: 529-534.

Ikubo, M., Wada, T., Fukui, K., Ishiki, M., Ishihara, H., Asano, T., Tsuneki, H. y Sasaoka, T. (2009). "Impact of lipid phosphatases SHIP2 and PTEN on the time and Akt-isoform-specific amelioration of TNF-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes". *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296: E157-164.

Jackson, L.P. (2014). "Structure and mechanism of COPI vesicle biogenesis". *Curr. Opin. Cell. Biol.* 29C: 67-73.

Jackowski, S., Wang, J. y Baburina, I. (2000). "Activity of the phosphatidylcholine biosynthetic pathway modulates the distribution of fatty acids into glycerolipids in proliferating cells". *Biochim. Biophys. Acta.* 1483: 301-315.

Jacobs, R.L., Zhao, Y., Koonen, D.P., Sletten, T., Su, B., Lingrell, S., Cao, G., Peake, D.A., Kuo, M.S., Proctor, S.D., Kennedy, B.P., Dyck, J.R. y Vance, D.E. (2010). "Impaired de novo choline synthesis explains why phosphatidylethanolamine N-methyltransferase-deficient mice are protected from diet-induced obesity". *J. Biol. Chem.* 285: 22403-22413.

Jacquier, N., Choudhary, V., Mari, M., Toulmay, A., Reggiori, F. y Schneider, R. (2011). "Lipid droplets are functionally connected to the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Cell Sci.* 124: 2424-2437.

Jahn, R. y Scheller, R.H. (2006). "SNAREs-engines for membrane fusion". *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 7: 631-43.

Jamaluddin, M.S., Weakley, S.M., Yao, Q. y Chen, C. (2012). "Resistin: functional roles and therapeutic considerations for cardiovascular disease". *Br. J. Pharmacol.* 165: 622-632.

Jambunathan, S., Yin, J., Khan, W., Tamori, Y. y Puri, V. (2011). "FSP27 promotes lipid droplet clustering and then fusion to regulate triglyceride accumulation". *PLOS One.* 6: e28614.

James, P.F., Lake, A.C., Hajra, A.K., Larkins, L.K., Robinson, M., Buchanan, F.G. y Zoeller, R.A. (1997). "An animal cell mutant with a deficiency in acyl/alkyl-dihydroxyacetonephosphate reductase activity. Effects on the biosynthesis of ether-linked and diacyl glycerolipids". *J. Biol. Chem.* 272: 23540-23546.

Jaworski, K., Ahmadian, M., Duncan, R.E., Sarkadi-Nagy, E., Varady, K.A., Hellerstein, M.K., Lee, H.Y., Samuel, V.T., Shulman, G.I., Kim, K.H., de Val, S., Kang, C. y Sul, H.S. (2009). "AdPLA ablation increases lipolysis and prevents obesity induced by high-fat feeding or leptin deficiency". *Nat. Med.* 15: 159-168.

- Jaworski, K., Sarkadi-Nagy, E., Duncan, R.E., Ahmadian, M. y Sul, H.S.** (2007). "Regulation of triglyceride metabolism. IV. Hormonal regulation of lipolysis in adipose tissue". *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* 293: G1-4.
- Jean, S y Kiger, A.A.** (2012). "Coordination between RAB GTPase and phosphoinositide regulation and functions". *Nature Reviews.* 13: 463-470.
- Jia, Z., Moulson, C.L., Pei, Z., Miner, J.H., Watkins, P.A.** (2007). "Fatty Acid Transport Protein 4 is the principal very long chain Fatty Acyl-CoA synthetase in skin fibroblasts". *J. Biol. Chem.* 282: 20573-20583.
- Jones, S., Newman, C., Liu, F. y Segev, N.** (2000). "The TRAPP complex is a nucleotide exchanger for Ypt1 and Ypt31/32". *Mol. Biol. Cell.* 11: 4403-4411.
- Jordens, I., Fernandez-Borja, M., Marsman, M., Dusseljee, S., Janssen, L., Calafat, J., Janssen, H., Wubbolts, R. y Neefjes J.** (2001). "The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors". *Curr. Biol.* 11: 1680-1685.
- Kalashnikova, M.M. y Fadeeva, E.O.** (2006). "Ultrastructural study of liver cells from rooks living in ecologically unfavorable areas". *Izv. Akad. Ser. Biol.* 2: 133-141.
- Kang, H.W., Wei, J. y Cohen, D.E.** (2010). "PC-TP/StARD2: of membranes and metabolism". *Trends. Endocrinol. Metab.* 21: 449-456.
- Kanzaki, M.** (2006). "Insulin receptor signals regulating GLUT4 translocation and actin dynamics". *Endocr. J.* 53: 267-293.
- Kassan, A., Herms, A., Fernández-Vidal, A., Bosch, M., Schieber, N.L., Reddy, B.J.N., Fajardo, A., Gelabert-Baldrich, M., Tebar, F., Enrich, C., Gross, S.P., Parton, R.G. y Pol, A.** (2013). "Acyl-CoA synthetase 3 promotes lipid droplet biogenesis in ER microdomains". *J. Cell Biol.* 203: 985-1001.
- Kawasaki, M., Nakayama, K. y Wakatsuki, S.** (2005). "Membrane recruitment of effector proteins by Arf and Rab GTPases". *Curr. Opin. Biol.* 15: 681-689.
- Keller, P., Petrie, J.T., De, Rose. P., Gerin, I., Wright, W.S., Chiang, S.H., Nielsen, A.R., Fischer, C.P., Pedersen, B.K. y MacDougald, O.A.** (2008). "Fat-specific protein 27 regulates storage of triacylglycerol". *J. Biol. Chem.* 283: 14355-14365.
- Kelley, D.E., Thaete, F.L., Troost, F., Huwe, T., Goodpaster y B.H.** (2000). "Subdivisions of subcutaneous abdominal adipose tissue and insulin resistance". *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 278: E941-948.
- Kershaw, E.E. y Flier, J.S.** (2004). "Adipose tissue as an endocrine organ". *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89: 2548-2556.
- Khaselev, N. y Murphy, R.C.** (1999). "Susceptibility of plasmenyl glycerophosphoethanolamine lipids containing arachidonate to oxidative degradation". *Free. Radic. Biol. Med.* 26: 275-284.

Khelef, N., Buton, X., Beatini, N., Wang, H., Meiner, V., Chang, T.Y., Farese, R.V.Jr., Maxfield, F.R. y Tabas, I. (1998). "Immunolocalization of acyl-coenzyme A: cholesterol *O*-acyltransferase in macrophages". *J. Biol. Chem.* 273: 11218-11224.

Kim, J.Y., Liu, K., Zhou, S., Tillison, K., Wu, Y. y Smas, C.M. (2008). "Assessment of fat-specific protein 27 in the adipocyte lineage suggests a dual role for FSP27 in adipocyte metabolism and cell death". *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 294: E654-667.

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

Kitamura, T., Kitamura, Y., Kuroda, S., Hino, Y., Ando, M., Kotani, K., Konishi, H., Matsuzaki, H., Kikkawa, U., Ogawa, W. y Kasuga, M. (1999). "Insulin-induced phosphorylation and activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B by the serine-threonine kinase Akt". *Mol. Cell Biol.* 19: 6286-6296.

Konige, M., Wang, H. y Sztalryd, C. (2013). "Role of adipose specific lipid droplet proteins in maintaining whole body energy homeostasis". *Biochim. Biophys. Acta.* 1842: 393-401.

Kornmann, B. y Walter, P. (2010). "ERMES-mediated ER-mitochondria contacts: molecular hubs for the regulation of mitochondrial biology". *J. Cell. Sci.* 123: 1389-1393.

Korycka, J., Lach, A., Heger, E., Boguslawska, D.M., Wolny, M., Toporkiewicz, M., Augoff, K., Korzeniewski, J. y Sikorski, A.F. (2012). "Human DHHC proteins: A spotlight on the hidden player of palmitoylation". *Europ. J. Cell. Biol.* 91: 107-117.

Kovanen, P.T., Nikkila, E.A. y Miettinen, T.A. (1975). "Regulation of cholesterol synthesis and storage in fat cells". *J. Lipid. Res.* 16: 211-223.

Krahmer, N., Guo, Y., Wilfling, F., Hilger, M., Lingrell, S., Heger, K., Newman, H.W., Schmidt-Suppran, M., Vance, D.E., Mann, M., Farese, R.V.Jr. y Walther, T.C. (2011). "Phosphatidylcholine synthesis for lipid droplet expansion is mediated by localized activation of CTP: Phosphocholine Cytidyltransferase". *Cell. Metab.* 14: 504-515.

Krahmer, N., Farese, R.V.Jr. y Walther, T.C. (2013). "Balancing the fat: lipid droplets and human disease". *EMBO Mol. Med.* 5: 905-915.

Kuerschner, L., Moessinger, C. y Thiele, C. (2008). "Imaging of lipid biosynthesis: how a neutral lipid enters lipid droplets". *Traffic.* 9: 338-352.

Kuo, Y.C., Huang, K.Y., Yang, C.H., Yang, Y.S., Lee, W.Y. y Chiang, C.W. (2008). "Regulation of phosphorylation of Thr-308 of Akt, cell proliferation, and survival by the B55alpha regulatory subunit targeting of the protein phosphatase 2A holoenzyme to Akt". *J. Biol. Chem.* 283: 1882-1892.

Kurlawalla-Martínez, C., Stiles, B., Wang, Y., Devaskar, S.U., Kahn, B.B. y Wu, H. (2005). "Insulin hypersensitivity and resistance to Streptozotocin-induced diabetes in mice lacking PTEN in adipose tissue". *Mol. Cell. Biol.* 25: 2498-2510

- Kuroda, T.S. y Fukuda, M.** (2004). "Rab27A-binding protein Slp2-a is required for peripheral melanosome distribution and elongated cell shape in melanocytes". *Nature Cell. Biol.* 6: 1195-1203.
- Lacey, D.J., Beaudoin, F., Dempsey, C.E., Shewry, P.R. y Napier, J.A.** (1999). "The accumulation of triacylglycerols within the endoplasmic reticulum of developing seeds of *Helianthus annuus*". *Plant J.* 17: 397-405.
- Lafontan, M.** (2008). "Advances in adipose tissue metabolism". *Int. J. Obes. (Lond).* 32 Suppl. 7: S39-51.
- Lafontan, M. y Langin, D.** (2009). "Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue". *Prog. Lipid Res.* 48: 275-297.
- Lagace, T.A. y Ridgway, N.D.** (2013). "The role of phospholipids in the biological activity and structure of the endoplasmic reticulum". *Biochim. Biophys. Acta.* 1833: 2499-2510.
- Lake, A.C., Sun, Y., Li, J.L., Kim, J.E., Johnson, J.W., Li, D., Revett, T., Shih, H.H., Liu, W., Paulsen, J.E. y Gimeno, R.E.** (2005). "Expression, regulation and triglyceride hydrolase activity of Adiponutrin family members". *J. Lipid Res.* 46: 2477-2487.
- Lass, A., Zimmermann, R., Haemmerle, G., Riederer, M., Schoiswohl, G., Schweiger, M., Kienesberger, P., Strauss, J.G., Gorkiewicz, G. y Zechner, R.** (2006). "Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome". *Cell. Metab.* 3(5): 309-319.
- Leber, R., Zinser, E., Zellnig, G., Paltauf, F. y Daum, G.** (1994). "Characterization of lipid particles of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*". *Yeast.* 10(11): 1421-1428.
- Lee, T.C.** (1998). "Biosynthesis and possible biological functions of plasmalogens". *Biochim. Biophys. Acta* 1394: 129-145.
- Lefterova, M.I. y Lazar, M.A.** (2009). "New developments in adipogenesis". *Trends Endocrinol. Metab.* 20: 107-114.
- Leung, K.F., Baron, R., Ali, B.R., Magee, A.I. y Seabra, M.C.** (2007). "Rab GTPases containing a CAAX Motif are processed post-geranylgeranylation by proteolysis and methylation". *J. Biol. Chem.* 282: 1487-1497.
- Levi, S.** (2010). "Non-vesicular lipid transport by lipid-transfer proteins and beyond". *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 739-750.
- Lewin, T.M., Van Horn, C.G., Krisans, S.K. y Coleman, R.A.** (2002). "Rat liver acyl-CoA synthetase 4 is a peripheral-membrane protein located in two distinct subcellular organelles, peroxisomes, and mitochondrial-associated membrane". *Arch. Biochem. Biophys.* 404: 263-270.
- Li, Y., Low, L-H., Putz, U., Goh, C-P., Tan, S-S. y Howitt, J.** (2014). "Rab5 and Ndfip1 are involved in Pten ubiquitination and nuclear trafficking". *Traffic.* En prensa.

Li, Y., Na, K., Lee, H.J., Lee, E.Y. y Paik, Y.K. (2011). "Contribution of sams-1 and pmt-1 to lipid homeostasis in adult *Caenorhabditis elegans*". *J. Biochem.* 149: 529-538.

Lieber, J.G. y Evans, R.M. (1996). "Disruption of the vimentin intermediate filament system during adipose conversion of 3T3-L1 cells inhibits lipid droplet accumulation". *J. Cell. Sci.* 109: 3047-3058.

Lippincott-Schwartz, J. (1993). "Bidirectional membrane traffic between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus". *Trends Cell. Biol.* 3: 81-88.

Listenberger, L.L., Ostermeyer-Fay, A.G., Goldberg, E.B., Brown, W.J. y Brown, D.A. (2007). "Adipocyte differentiation-related protein reduces the lipid droplet association of adipose triglyceride lipase and slows triacylglycerol turnover". *J. Lipid. Res.* 48: 2751-2761.

Liu, K., Zhou, S., Kim, J.Y., Tillison, K., Majors, D., Rearick, D., Lee, J.H., Fernandez-Boyanapalli, R.F., Barricklow, K., Houston, M.S. y Smas, C.M. (2009). "Functional analysis of FSP27 protein regions for lipid droplet localization, caspase-dependent apoptosis, and dimerization with CIDEA". *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297: 1395-1413.

Liu, P., Ying, Y., Zhao, Y., Mundy, D.I., Zhu, M. y Anderson, R.G. (2004). "Chinese hamster ovary K2 cell lipid droplets appear to be metabolic organelles involved in membrane traffic". *J. Biol. Chem.* 279: 3787-3792.

Liu, P., Bartz, R., Zehmer, J.K. and Ying, Y.S., Zhu, M., Serrero, G. y Anderson, R.G. (2007). "Rab-regulated interaction of early endosomes with lipid droplets". *Biochim. Biophys. Acta.* 1773: 784-793.

Liu, Q., Siloto, R.M., Lehner, R., Stone, S.J. y Weselake, R.J. (2012). "Acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase: molecular biology, biochemistry and biotechnology". *Prog. Lipid Res.* 51: 350-377.

Lodhi, I.J., Yin, L., Jensen-Urstad, A.P.L., Funai, K., Coleman, T., Baird, J.H., El Ramahi, M.K., Razani, B., Song, H., Fu-Hsu, F., Turk, J., Semenkovich, C.F. (2012). "Inhibiting adipose tissue lipogenesis reprograms thermogenesis and PPAR γ activation to decrease diet-induced obesity". *Cell. Metab.* 16: 189-201.

Londos, C., Sztalryd, C., Tansey, J. y Kimmel, A. (2005). "Role of PAT proteins in lipid metabolism". *Biochimie.* 87: 45-49.

Lonnqvist, F., Thome, A., Nilsell, K., Hoffstedt, J. y Arner, P. (1995). "A pathogenic role of visceral fat beta 3-adrenoceptors in obesity". *J. Clin. Invest.* 95: 1109-1116.

López, J.A., Burchfield, J.G., Blair, D.H., Mele, K., Ng, Y., Valloton, P., James, D.E. y Hughes, W.E. (2009). "Identification of a distal GLUT4 trafficking event controlled by actin polymerization". *Mol. Biol. Cell.* 20: 3918-3929.

Lutcke, A., Parton, R.G., Murphy, C., Olkkonen, V.M., Dupree, P., Valencia, A., Simons, K. y Zerial, M. (1994). "Cloning and subcellular localization of novel rab proteins reveals polarized and cell type-specific expression". *J. Cell Sci.* 107: 3437-3448.

- Malagón M.M., Díaz-Ruiz A., Guzmán-Ruiz R., Jiménez-Gómez Y., Moreno N.R., García-Navarro S., Vázquez-Martínez R. y Peinado J.R.** (2013) "Adipobiology for Novel Therapeutic Approaches in Metabolic Syndrome". *Curr. Vasc. Pharmacology*. 11: 954-967.
- Manning, B.D. y Cantley, L.C.** (2007). "AKT/PKB signaling: navigating downstream". *Cell*. 129: 1261-1274.
- Mantzoros, C.S., Magkos, F., Brinkoetter, M., Sienkiewicz, E., Dardeno, T.A., Kim, S.Y., Hamnvik, O.P. y Koniaris, A.** (2011). "Leptin in human physiology and pathophysiology". *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 301: E567-584.
- Marcinkiewicz, A., Gauthier, D., Garcia, A. y Brasaemle, D.L.** (2006). "The phosphorylation of serine 492 of perilipin A directs lipid droplet fragmentation and dispersion". *J. Biol. Chem.* 281: 11901-11909.
- Martin, S., Driessen, K., Nixon, S.J., Zerial, M. y Parton, R.G.** (2005). "Regulated localization of Rab18 to lipid droplets: Effects of lipolytic stimulation and inhibition of lipid droplet catabolism". *J. Biol. Chem.* 280: 42325-42335.
- Martin, S. y Parton, R.G.** (2006). "Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle". *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 7: 373-378.
- Martinez-Botas, J., Anderson, J.B., Tessier, D., Lapillonne, A., Chang, B.H., Quast, M.J., Gorenstein, D., Chen, K.H. y Chan, L.** (2000). "Absence of perilipin results in leanness and reverses obesity in *Lepr(db/db)* mice". *Nat. Genet.* 26: 474-479.
- Matarese, V. y Bernlohr, D.A.** (1988). "Purification of murine adipocyte lipid-binding protein. Characterization as a fatty acid- and retinoic acid-binding protein". *J. Biol. Chem.* 263: 14544-14551.
- Mathis, D.** (2013). "Immunological Goings-on in Visceral Adipose Tissue". *Cell. Metabolism*. 17: 851-859.
- Matsuda, S., Kobayashi, M. y Kitasigi, Y.** (2013). "Roles for PI3K/AKT/PTEN Pathway in Cell Signaling of Nonalcoholic Fatty Liver Disease". *ISRN Endocrinology*. 2013: 472432.
- Maury, E. y Brichard, S.M.** (2010). "Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome". *Mol. Cell. Endocrinol.* 314: 1-16.
- McFie, P.J., Banman, S.L., Kary, S. y Stone, S.J.** (2011). "Murine diacylglycerol acyltransferase-2 (DGAT2) can catalyze triacylglycerol synthesis and promote lipid droplet formation independent of its localization to the endoplasmic reticulum". *J. Biol. Chem.* 286: 28235-28246.
- McGarry, J.D.** (1992). "What if Minkowski had been ageusic? An alternative angle on diabetes". *Science*. 258: 766-770.
- McIntosh, A.L., Senthivayagam, S., Moon, K.C., Gupta, S., Lwande, J.S., Murphy, C.C., Storey, S.M. y Atshaves, B.P.** (2012). "Direct interaction of Plin2 with lipids on the surface of lipid droplets: a live cell FRET analysis". *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 303: C728-742.

- McIntosh, A.L., Storey, S.M. y Atshaves, B.P.** (2010). "Intracellular lipid droplets contain dynamic pools of sphingomyelin: ADRP binds phospholipids with high affinity". *Lipids*. 45: 465-477.
- McQuaid, S.E., Hodson, L., Neville, M.J., Dennis, A.L., Cheeseman, J., Humphreys, S.M., Ruge, T., Gilbert, M., Fielding, B.A., Frayn, K.N. y Karpe, F.** (2011). "Downregulation of adipose tissue fatty acid trafficking in obesity: a driver for ectopic fat deposition?". *Diabetes*. 60: 47-55.
- Medina-Gómez, G.** (2012). "Mitochondria and endocrine function of adipose tissue". *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 26: 791-804.
- Miaczynska, M., Pelkmans, L. y Zerial, M.** (2004). "Not just a sink: endosomes in control of signal transduction". *Curr. Opin. Cell. Biol.* 16: 400-406.
- Millership, S., Ninkina, N., Guschina, I.A., Nortona, J., Brambilla, R. and Oort, P.J., Adams, S.H., Dennis, R.J., Voshol, P.J., Rochford, J.J. y Buchman, V.L.** (2012). "Increased lipolysis and altered lipid homeostasis protect γ -synuclein-null mutant mice from diet-induced obesity". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 109: 20943-20948.
- Millership, S., Ninkina, N., Rochford, J.J. y Buchman, V.L.** (2013). " γ -synuclein is a novel player in the control of body lipid metabolism". *Adipocyte*. 2: 276-280.
- Mitsche, M.A., Wang, L. y Small, D.M.** (2010). "Adsorption of egg phosphatidylcholine to an air/water and triolein/water bubble interface: use of the 2-dimensional phase rule to estimate the surface composition of a phospholipid/triolein/water surface as a function of surface pressure". *J. Phys. Chem. B*. 114: 3276-3284.
- Miura, S., Gan, J.W., Brzostowski, J., Parisi, M.J., Schultz, C.J., Londos, C., Oliver, B. y Kimmel, A.R.** (2002). "Functional conservation for lipid storage droplet association among Peripilin, ADRP, and TIP47 (PAT)-related proteins in mammals, *Drosophila* and *Dictyostelium*". *J. Biol. Chem.* 277: 32253-32257.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M. y Klionsky, D.J.** (2008). "Autophagy fights disease through cellular self-digestion". *Nature*. 451: 1069-1075.
- Modarressi, M.H., Cheng, M., Tarnasky, H.A., Lamarche-Vane, N., de Rooij, D.G., Ruan, Y. y van der Hoon, F.A.** (2004). "A Novel Testicular RhoGAP-Domain Protein Induces Apoptosis". *Biol. Reprod.* 71: 1980-1990.
- Modrianský, M. y Dvorák, Z.** (2005). "Microtubule disruptors and their interaction with biotransformation enzymes". *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc. Czech. Republic*. 149: 213-215.
- Moessinger, C., Kuerschner, L., Spandl, J., Shevchenko, A. y Thiele, C.** (2011). "Human lysophosphatidylcholine acyltransferases 1 and 2 are located in lipid droplets where they catalyze the formation of phosphatidylcholine". *J. Biol. Chem.* 286: 21330-21339.

- Molero, J.C., Whitehead, J.P., Meerloo, T. y James, D.E.** (2001). "Nocodazole Inhibits Insulin-stimulated Glucose Transport in 3T3-L1 Adipocytes via a Microtubule-independent Mechanism". *J. Biol. Chem.* 276: 43829-43835.
- Moore, H.P., Silver, R.B., Mottillo, E.P., Bernlohr, D.A. y Granneman, J.G.** (2005). "Perilipin targets a novel pool of lipid droplets for lipolytic attack by hormone-sensitive lipase". *J. Biol. Chem.* 280: 43109-43120.
- Moro, C., Galitzky, J., Sengenès, C., Crampes, F., Lafontan, M. y Berlan, M.** (2004). "Functional and pharmacological characterization of the natriuretic peptide-dependent lipolytic pathway in human fat cells". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 308(3): 984-992.
- Murphy, D.J.** (2001). "The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms". *Prog. Lipid Res.* 40: 325-438.
- Murphy, D.J. y Vance, J.** (1999). "Mechanisms of lipid-body formation". *Trends Biochem. Sci.* 24: 109-115.
- Murphy, S., Martin, S. y Parton, R.G.** (2009). "Lipid droplet-organelle interactions; sharing the fats". *Biochim. Biophys. Acta.* 1791: 441-447.
- Murphy, S., Martin, S. y Parton, R.G.** (2010). "Quantitative analysis of lipid droplet fusion: inefficient steady state fusion but rapid stimulation by chemical fusogens". *PLOS One.* 5: e15030.
- Mushid, A. y Presley, J.F.** (2004). "ER-to-Golgi transport and cytoskeletal interactions in animal cells". *Cell. Mol. Life. Sci.* 61: 133-145.
- Nagan, N. y Zoeller, R.A.** (2001). "Plasmalogens: biosynthesis and functions". *Prog. Lipid Res.* 40: 199-229.
- Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Eto, K., Yamashita, H., Ohsugi, M., Otsu, M., Hara, K., Ueki, K., Sugiura, S., Yoshimura, K., Kadowaki, T. y Nagai, R.** (2009). "CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity". *Nat. Med.* 15: 914-920.
- Nishino, N., Tamori, Y., Tateya, S., Kawaguchi, T., Shibakusa, T., Mizunoya, W., Inoue, K., Kitazawa, R., Kitazawa, S., Matsuki, Y., Hiramatsu, R., Masubuchi, S., Omachi, A., Kimura, K., Saito, M., Amo, T., Ohta, S., Yamaguchi, T., Osumi, T., Cheng, J., Fujimoto, T., Nakao, K., Aiba, A., Okamura, H., Fushiki, T. y Katsuga, M.** (2008). "FSP27 contributes to efficient energy storage in murine white adipocytes by promoting the formation of unilocular lipid droplets". *J. Clin. Investig.* 118: 2808-2821.
- Novikoff, A.B., Novikoff, P.M., Rosen, O.M. y Rubin, C.S.** (1980). "Organelle relationships in cultured 3T3-L1 preadipocytes". *J. Cell. Biol.* 87: 180-196.
- Novikoff, A.B. y Novikoff, P.M.** (1982). "Microperoxisomes and peroxisomes in relation to lipid metabolism". *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 386: 138-152.

- Numrich, J. y Ungermann, C.** (2014). "Endocytic Rabs in membrane trafficking and signalling". *Biol. Chem.* 395: 327-333
- Ohsaki, Y., Maeda, T., Maeda, M., Tauchi-Sato, K. y Fujimoto, T.** (2006). "Recruitment of TIP47 to lipid droplets is controlled by the putative hydrophobic cleft". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 347: 279-287.
- Ohsaki, Y., Cheng, J., Suzuki, M., Fujita, A. y Fujimoto, T.** (2008). "Lipid droplets are arrested in the ER membrane by tight binding of lipidated apolipoprotein B-100". *J. Cell. Sci.* 121: 2415-2422.
- Olayioye, M.A., Vehring, S., Muller, P., Herrmann, A., Schiller, J., Thiele, C., Lindeman, G.J., Visvader, J.E. y Pomorski, T.** (2005). "StarD10, a START domain protein overexpressed in breast cancer, functions as a phospholipid transfer protein". *J. Biol. Chem.* 280: 27436-27442.
- Olefsky, J.M. y Glass, C.K.** (2010). "Macrophages, inflammation, and insulin resistance". *Annu. Rev. Physiol.* 72: 219-246.
- Olofsson, S.O., Boström, P., Andersson, L., Rutberg, M., Levin, M., Perman, J. y Borén, J.** (2008). "Triglyceride containing lipid droplets and lipid droplet-associated proteins". *Curr. Opin. Lipidol.* 19: 441-447.
- Olofsson, S.O., Andersson, L., Haversen, L., Olsson, C., Myhre, S., Rutberg, M., Mobini, R., Li, L., Lu, E., Borén, J. y Boström, P.** (2011). "The formation of lipid droplets: possible role in the development of insulin resistance/type 2 diabetes". *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 85: 215-218.
- O'Rourke, R.W., Metcalf, M.D., White, A.E., Madala, A., Winters, B.R., Maizlin, I.I., Jobe, B.A., Roberts Jr., C.T., Slifka, M.K. y Marks, D.L.** (2009). "Depot-specific differences in inflammatory mediators and a role for NK cells and IFN-gamma in inflammation in human adipose tissue". *Int. J. Obes. (Lond).* 33: 978-990.
- Osman, C., Voelker, D.R. y Langer, T.** (2011). "Making heads or tails phospholipids in mitochondria". *J. Cell Biol.* 192: 7-16.
- Ost, A., Ortegren, U., Gustavsson, J., Nystrom, F.H. y Stralfors, P.** (2005). "Triacylglycerol is synthesized in a specific subclass of caveolae in primary adipocytes". *J. Biol. Chem.* 280: 5-8.
- Ostermeier C. y Brunger A.T.** (1999). "Structural basis of Rab effector specificity: crystal structure of the small G protein Rab3A complexed with the effector domain of rabphilin-3A". *Cell.* 96: 363-374.
- Oswal, A. y Yeo, G.** (2010). "Leptin and the control of body weight: a review of its diverse central targets, signaling mechanisms, and role in the pathogenesis of obesity". *Obesity (Silver Spring)*. 18: 221-229.
- Otto, T.C. y Lane, M.D.** (2005). "Adipose development: from stem cell to adipocyte". *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 40: 229-242.

- Ouchi, N., Parker, J.L., Lugus, J.J. y Walsh, K.** (2011). "Adipokines in inflammation and metabolic disease". *Nat. Rev. Immunol.* 11: 85-97.
- Ouimet, M., Franklin, V., Mak, E., Liao, X., Tabas, I. y Marcel, Y.L.** (2011). "Autophagy regulates cholesterol efflux from macrophage foam cells via lysosomal acid lipase". *Cell. Metab.* 13: 655-667.
- Owen, O.E., Kalhan, S.C. y Hanson, R.W.** (2002). "The key role of Anaplerosis and Cataplerosis for citric acid cycle function". *J. Biol. Chem.* 277: 30409-304012.
- Ozeki, S., Cheng, J., Tauchi-Sato, K., Hatano, N., Taniguchi, H. y Fujimoto, T.** (2005). "Rab18 localizes to lipid droplets and induces their close apposition to the endoplasmic reticulum-derived membrane". *J. Cell Sci.* 118: 2601-2611.
- Paar, M., Jungst, C., Steiner, N.A., Magnes, C., Sinner, F., Kolb, D., Lass, A., Zimmermann, R., Zumbusch, A., Kohlwein, S.D. y Wolinski, H.** (2012). "Remodeling of lipid droplets during lipolysis and growth in adipocytes". *J. Biol. Chem.* 287: 11164-11173.
- Pal, A., Barber, T.M., Van de Bunt, M., Rudge, S.A., Zhang, Q., Lachlan, K.L., Cooper, N.S., Linden, H., Levy, J.C., Wakelam, M.J.O., Walker, L., Karpe, F. y Gloyn, A.L.** (2012). "PTEN mutations as a cause of constitutive insulin sensitivity and obesity". *N. Engl. J. Med.* 367: 1002-1011.
- Pardo, R., Enguix, N., Lasheras, J., Felui, J.E., Kralli, A. y Villena, J.A.** (2011). "Rosiglitazone-induced mitochondrial biogenesis in White adipose tissue is independent of peroxisome proliferator-activated receptor c Coactivador-1a". *PLOS One.* 6: e26989.
- Parton, R.G. y Simons, K.** (2007). "The multiple faces of caveolae". *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8: 185-194.
- Peinado, J.R., Diaz-Ruiz, A., Frühbeck, G. y Malagón, M.M.** (2011). "Mitochondria in metabolic disease: Getting clues from proteomic studies". *Proteomics.* 14: 452-466.
- Pellon-Maison, M., Montanaro, M.A., Coleman, R.A. y Gonzalez-Baro, M.R.** (2007). "Mitochondrial glycerol-3-P acyltransferase 1 is most active in outer mitochondrial membrane but not in mitochondrial associated vesicles (MAV)". *Biochim. Biophys. Acta.* 1771: 830-838.
- Penno, A., Hackenbroich, G. y Thiele, C.** (2013). "Phospholipids and lipid droplets". *Biochim. Biophys. Acta.* 1831: 589-594.
- Pessin, J.E. y Saltiel, A.R.** (2000). "Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance". *J. Clin. Invest.* 106: 165-169.
- Pfeffer, S.R.** (2005). "Filling the Rab GAP". *Nat. Cell Biol.* 7: 856-857.
- Pfeffer, S.R.** (2013). "Rab GTPase regulation of membrane identity". *Curr. Opin. Cell Biol.* 25: 414-419.
- Pfeffer, S.R. y Aivazian, D.** (2004). "Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments". *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 886-96.

- Phillips, S.A., Ciaraldi, T.P., Oh, D.K., Savu, M.K. y Henry, R.R.** (2008). "Adiponectin secretion and response to pioglitazone is depot dependent in cultured human adipose tissue". *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295: E842-E850.
- Pietiläinen, K.H., Róg, T., Seppänen-Laakso, T., Virtue, S., Gopalacharyulu, P., Tang, J., Rodriguez-Cuenca, S., Maciejewski, A., Naukkarinen, J., Ruskeepää, A.-L., Niemelä, P.S.,** (2011). "Association of Lipidome Remodeling in the Adipocyte Membrane with Acquired Obesity in Humans". *PLOS Biol.* 9: e1000623.
- Pischon, T., Hu, F.B., Girman, C.J., Rifai, N., Manson, J.E., Rexrode, K.M. y Rimm, E.B.** (2011). "Plasma total and high molecular weight adiponectin levels and risk of coronary heart disease in women". *Atherosclerosis.* 219: 322-329.
- Ploegh, H.** (2007). "A lipid-based model for the creation of an escape hatch from the endoplasmic reticulum". *Nature.* 448: 435-438.
- Pol, A., Martin, S., Fernandez, M. A., Ferguson, C., Carozzi, A., Luetterforst, R., Enrich, C. y Parton, R.G.** (2004). "Dynamic and regulated association of Caveolin with lipid bodies: Modulation of lipid body motility and function by a dominant negative mutant". *Mol. Biol. Cell.* 15: 99-110.
- Pol, A., Gross, S.P. y Parton, R.G.** (2014). "Biogenesis of the multifunctional droplet: Lipids, proteins and sites". *J. Cell. Biol.* 204: 635-646.
- Porteiro, B., Díaz-Ruiz, A., Martínez, G., Senra, A., Vidal, A., Serrano, M., Gualillo, O., López, M., Malagón, M.M., Diéguez, C. y Nogueiras, R.** (2013). "Ghrelin requires p53 to stimulate lipid storage in fat and liver". *Endocrinology.* 154: 3671-3679.
- Prattes, S., Horl, G., Hammer, A., Blaschitz, A., Graier, W.F., Sattler, W., Zechner, R. y Steyrer, E.** (2000). "Intracellular distribution and mobilization of unesterified cholesterol in adipocytes: triglyceride droplets are surrounded by cholesterol-rich ER-like surface layer structures". *J. Cell. Sci.* 113: 2977-2989.
- Pulido, M.R., Diaz-Ruiz, A., Jimenez-Gomez, Y., Garcia-Navarro, S., Gracia-Navarro, F., Tinahones, F., Lopez-Miranda, J., Fruhbeck, G., Vazquez-Martinez, R. y Malagon M.M.** (2011). "Rab18 dynamics in adipocytes in relation to lipogenesis, lipolysis and obesity". *PLoS One* 6: e22931.
- Pulido, M.R., Rabanal-Ruiz, Y., Almabouada, F., Díaz-Ruiz, A., Burrell, M., Vázquez, M., Castaño, J., Kineman, R.D., Luque, R.M., Diéguez, C., Vázquez-Martínez, R. y Malagón, M.M.** (2013). "Nutritional, hormonal, and depot-dependent regulation of the expression of the small GTPase Rab18 in rodent adipose tissue". *J. Mol. Endocrinol.* 50: 19-29.
- Puri, V., Konda, S., Ranjit, S., Aouadi, M., Chawla, A., Chakladar, M. y Czech, M.P.** (2007). "Fat-specific protein 27, a novel lipid droplet protein that enhances triglyceride storage". *J. Biol. Chem.* 282: 34213-34218.

- Puri, V., Virbasius, J.V., Guilherme, A. y Czech, M.P.** (2008a). "RNAi screens reveal novel metabolic regulators: RIP140, MAP4k4 and the lipid droplet associated fat specific protein (FSP27)". *Acta Physiol.* 192: 103-115.
- Puri, V., Ranjit, S., Konda, S., Nicoloso, S.M., Straubhaar, J., Chawla, A., Chouinard, M., Lin, C., Burkart, A., Corvera, S., Perugini, R.A. y Czech, M.P.** (2008b). "Cidea is associated with lipid droplets and insulin sensitivity in humans". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105: 7833-7838.
- Qi, J., Gong, J., Zhao, T., Zhao, J., Lam, P., Ye, J., Li, J.Z., Wu, J., Zhou, H.M. y Li, P.** (2008). "Downregulation of AMP-activated protein kinase by Cidea-mediated ubiquitination and degradation in brown adipose tissue". *EMBO J.* 27: 1537-1548.
- Qureshi, K. y Abrams, G.A.** (2007). "Metabolic liver disease of obesity and role of adipose tissue in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease". *World. J. Gastroenterol.* 13: 3540-3553.
- Rahn, T., Ridderstråle, M., Tornqvist, H., Manganiello, V., Fredrikson, G., Belfrage, P. y Degerman, E.** (1994). "Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced activation and phosphorylation of the cGMP-inhibited cAMP phosphodiesterase in rat adipocytes. Studies using the selective inhibitor wortmannin". *FEBS Lett.* 350: 314-318.
- Rains, J.L. y Jain, S.K.** (2011). "Oxidative stress, insulin signaling and diabetes". *Free Radic. Med.* 50: 567-575.
- Rai, P.D., Huang, B.W. y Tsuji, Y.** (2012). "Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling". *Cell. Signal.* 5: 981-990.
- Raychaudhuri, S. y Prinz, W.A.** (2008). "Nonvesicular phospholipid transfer between peroxisomes and the endoplasmic reticulum". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105: 15785-15790.
- Razani, B. y Lisanti, M.P.** (2001). "Two distinct caveolin-1 domains mediate the functional interaction of caveolin-1 with protein kinase A". *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 281: C1241-1250.
- Reue, K.** (2011). "Lipid droplet storage and metabolism: from yeast to man". *J. Lipid Res.* 52: 1865-1868.
- Ritcher, T., Floetenmeyer, M., Ferguson, C., Galea, J., Goh, J., Lindsay, M.R., Morgan, G.P., Marsh, B.J. y Parton, R.G.** (2007). "High-resolution 3D quantitative analysis of caveolar ultrastructure and caveola-cytoskeleton interactions". *Traffic.* 9: 893-909.
- Rizzo, W.B., Craft, D.A., Dammann, A.L. y Phillips, M.W.** (1987). "Fatty alcohol metabolism in cultured human fibroblasts. Evidence for fatty alcohol cycle". *J. Biol. Chem.* 262: 17412-17419.
- Rizzo, W.B., Craft, D.A., Judd, L.L., Moser, H.W. y Moser, A.B.** (1993). "Fatty alcohol accumulation in the Autosomal Recessive form of Rhizomelic Chondrodysplasia Punctata". *Biochem. Med. Metab. Biol.* 50: 93-102.
- Robenek, H., Robenek, M.J. y Troyer, D.** (2005). "PAT family proteins pervade lipid droplet cores". *J. Lipid Res.* 46: 1331-1338.

- Robenek, M.J., Severs, N.J., Schlattmann, K., Plenz, G., Zimmer, K.P., Troyer, D. y Robenek, H.** (2004). "Lipids partition caveolin-1 from ER membranes into lipid droplets: Updating the model of lipid droplet biogenesis". *FASEB J.* 18: 866-868.
- Rodeheffer, M.S., Birsoy, K. y Friedman, J.M.** (2008). "Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo". *Cell.* 135: 240-249.
- Rodemer, C., Thai, T.P., Brugger, B., Kaercher, T., Werner, H., Nave, K.A., Wieland, F., Gorgas, K. y Just, W.W.** (2003). "Inactivation of ether lipid biosynthesis causes male infertility, defects in eye development and optic nerve hypoplasia in mice". *Hum. Mol. Genet.* 12: 1881-1895.
- Rodriguez-Cuenca, S., Carobbio, S., Velagapudi, V.R., Barbaroja, N., Moreno-Navarrete, J.M., Tinahones, F.C., Fernandez-Real, J.M., Oresic, M. y Vidal-Puig, A.** (2012). "Peroxisome proliferator-activated receptor γ -dependent regulation of lipolytic nodes and metabolic flexibility". *Mol. Cell. Biol.* 32: 1555-1565.
- Roland, J.T., Kenworthy, A.K., Peranen, J., Caplan, S. y Goldenring, J.R.** (2007). "Myosin Vb interacts with Rab8a on a tubular network containing EHD1 and EHD3". *Mol. Biol. Cell.* 18: 2828-2837.
- Rosen, E.D. y MacDougald, O.A.** (2006). "Adipocyte differentiation from the inside out". *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 7: 885-896.
- Rosen, E.D. y Spiegelman, B.M.** (2006). "Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis". *Nature.* 444: 847-853.
- Ryden, M., Dicker, A., van Harmelen, V., Hauner, H., Brunberg, M., Perbeck, L., Lonnqvist, F. y Arner, P.** (2002). "Mapping of early signaling events in tumor necrosis factor- α -mediated lipolysis in human fat cells". *J. Biol. Chem.* 277: 1085-1091.
- Sacher, M., Kim, Y.G., Lavie, A., Oh, B.H. y Segev, N.** (2008). "The TRAPP complex: insights into its architecture and function". *Traffic.* 9: 2032-2042.
- Salans, L.B., Horton, E.S. y Sims, E.A.** (1971). "Experimental obesity in man: cellular character of the adipose tissue". *J. Clin. Invest.* 50: 1005-1011.
- Saltiel, A.R. y Kahn, C.R.** (2001). "Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism". *Nature.* 414: 799-806.
- Samuel, V.T., Petersen, K.F. y Shulman, G.I.** (2010). "Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism". *Lancet.* 375: 2267-2277.
- Samuel, V.T. y Shulman, G.I.** (2012). "Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links". *Cell.* 148: 852-871.
- Sano, H., Eguez, L., Teruel, M.N., Fukuda, M., Chuang, T.D., Chavez, J.A., Lienhard, G.E. y McGraw, T.E.** (2007). "Rab10, a target of the AS160 Rab GAP, is required for insulin-stimulated translocation of GLUT4 to the adipocyte plasma membrane". *Cell Metab.* 5: 293-303.

- Schrader, M.** (2001). "Tubulo-Reticular clusters of peroxisomes in living COS-7 cells: Dynamic behavior and association". *J. Histochem. Cytochem.* 49: 1421-1429.
- Schrader, M. y Fahimi H.D.** (2006). "The peroxisome: still a mysterious organelle". *Histochem. Cell Biol.* 129: 421-440.
- Schrader, M. y Yoon, Y.** (2007). "Mitochondria and peroxisomes: are the 'big brother' and the 'little sister' closer than assumed?". *Bioessays.* 29: 1105-1114.
- Schumacher, M.M., Choi, J.Y. y Voelker, D.R.** (2002). "Phosphatidylserine transport to the mitochondria is regulated by ubiquitination". *J. Biol. Chem.* 277: 51033-51042.
- Seabra, M.C. y Wasmeier, C.** (2004). "Controlling the location and activation of Rab GTPases". *Curr. Opin. Cell Biol.* 16: 451-457.
- Sengenes, C., Berlan, M., de Glisezinski, I., Lafontan, M. y Galitzky J.** (2000). "Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes". *FASEB J.* 14: 1345-1351.
- Sengenes, C., Bouloumie, A., Hauner, H., Berlan, M., Busse, R., Lafontan, M. y Galitzky, J.** (2003). "Involvement of a cGMP-dependent pathway in the natriuretic peptide-mediated hormone-sensitive lipase phosphorylation in human adipocytes". *J. Biol. Chem.* 278: 48617-48626.
- Sethi, J.K. y Vidal-Puig, A.J.** (2007). "Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation". *J. Lipid. Res.* 48: 1253-1262.
- Shan, D., Li, J.L., Wu, L., Hurov, J., Tobin, J.F., Gimeno, R.E. y Cao, J.** (2010). "GPAT3 and GPAT4 are regulated by insulin-stimulated phosphorylation and play distinct roles in adipogenesis". *J. Lipid. Res.* 51: 1971-1981.
- Shaw, C.S., Jones, D.A. y Wagenmakers, A.J.** (2008). "Network distribution of mitochondria and lipid droplets in human muscle fibres". *Histochem. Cell. Biol.* 129: 65-72.
- Shen, W.J., Liang, Y., Hong, R., Patel, S., Natu, V., Sridhar, K., Jenkins, A., Bernlohr, D.A. y Kraemer, F.B.** (2001). "Characterization of the functional interaction of adipocyte lipid-binding protein with hormone-sensitive lipase". *J. Biol. Chem.* 276: 49443-49448.
- Shiao, Y.J., Lupo, G. y Vance, J.E.** (1995). "Evidence that phosphatidylserine is imported into mitochondria via a mitochondria-associated membrane and that the majority of mitochondrial phosphatidylethanolamine is derived from decarboxylation of phosphatidylserine". *J. Biol. Chem.* 270: 11190-11198.
- Siniosoglou, S., Peak-Chew, S.Y. y Pelham, H.R.** (2000). "Ric1p and Rgp1p form a complex that catalyses nucleotide exchange on Ypt6p". *EMBO J.* 19: 4885-4894.
- Skinner, J.R., Shew, T.M., Schwartz, D.M., Tzekov, A., Lepus, C.M., Abumrad, N.A. y Wolins, N.E.** (2009). "Diacylglycerol enrichment of endoplasmic reticulum or lipid droplets recruits perilipin 3/TIP47 during lipid storage and mobilization". *J. Biol. Chem.* 284: 30941-30948.

Slocum, N., Durrant, J.R., Bailey, D., Yoon, L., Jordan, H., Barton, J., Brown, R.H., Clifton, L., Milliken, T., Harrington, W., Kimbrough, C., Faber, C.A., Cariello, N. y Elangbam, C.S. (2013). "Responses of brown adipose tissue to diet-induced obesity, exercise, dietary restriction and ephedrine treatment". *Exp. Toxicol. Pathol.* 65: 549-57.

Smith, A.J., Thompson, B.R., Sanders, M.A. y Bernlohr, D.A. (2007). "Interaction of the adipocyte fatty acid-binding protein with the hormone-sensitive lipase: regulation by fatty acids and phosphorylation". *J. Biol. Chem.* 282: 32424-32432.

Snijder, M.B., Dekker, J.M., Visser, M., Bouter, L.M., Stehouwer, C.D., Kostense, P.J., Yudkin, J.S., Heine, R.J., Nijpels, G. y Seidell, J.C. (2003). "Associations of hip and thigh circumferences independent of waist circumference with the incidence of type 2 diabetes: the Hoorn Study". *Am. J. Clin. Nutr.* 77: 1192-1197.

Soni, K.G., Mardones, G.A., Sougrat, R., Smirnova, E., Jackson, C.L. y Bonifacino, J.S. (2009). "Coatmer-dependent protein delivery to lipid droplets". *J. Cell Sci.* 122: 1834-1841.

Sönnichsen, B., De Renzis, S., Nielsen, E., Rietdorf, J. y Zerial, M. (2000). "Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11". *J. Cell Biol.* 149: 901-914.

Souza, S.C., Palmer, H.J., Kang, Y.H., Yamamoto, M.T., Muliro, K.V., Paulson, K.E. y Greenberg, A.S. (2003). "TNF-alpha induction of lipolysis is mediated through activation of the extracellular signal related kinase pathway in 3T3-L1 adipocytes". *J. Cell. Biochem.* 89: 1077-1086.

Spandl, J., White, D.J., Peychl, J. y Thiele, C. (2009). "Live cell multicolor imaging of lipid droplets with a new dye, LD540". *Traffic.* 10: 1579-1584.

Spalding, K.L., Arner, E., Westermark, P.O., Bernard, S., Buchholz, B.A., Bergmann, O., Blomqvist, L., Hoffstedt, J., Naslund, E., Britton, T., Concha, H., Hassan, M., Ryden, M., Frisen, J. y Arner, P. (2008). "Dynamics of fat cell turnover in humans". *Nature* 453: 783-787.

Stemberger, B.H., Walsh, R.M. y Patton, S. (1984). "Morphometric evaluation of lipid droplet associations with secretory vesicles, mitochondria and other components in the lactating cell". *Cell. Tissue. Res.* 236: 471-475.

Stenmark, H., Parton, R.G., Steele-Mortimer, O. y Lütcke, A. (1994). "Inhibition of Rab5 GTPase activity simulates membrane fusion in endocytosis". *EMBO. J.* 13: 1287-1296.

Stenmark, H. y Olkkonen, V.M. (2001). "The Rab GTPase family". *Genome. Biol.* 2: REVIEWS3007.

Stenmark H. (2009). "Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic". *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10: 513-525.

Stone, S.J. y Vance, J.E. (2000). "Phosphatidylserine synthase-1 and -2 are localized to mitochondria-associated membranes". *J. Biol. Chem.* 275: 34534-34540.

- Stone, S.J., Levin, M.C. y Farese, R.V.Jr.** (2006). "Membrane topology and identification of key functional amino acid residues of murine acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase-2". *J. Biol. Chem.* 281: 40273-40282.
- Stone, S.J., Levin, M.C., Zhou, P., Han, J., Walther, T.C. y Farese, R.V.Jr.** (2009). "The endoplasmic reticulum enzyme DGAT2 is found in mitochondria-associated membranes and has a mitochondrial targeting signal that promotes its association with mitochondria". *J. Biol. Chem.* 284: 5352-5361.
- Storey, S.M., McIntosh, A.L., Senthivayagam, S., Moon, K.C. y Atshaves, B.P.** (2011). "The phospholipid monolayer associated with perilipin-enriched lipid droplets is a highly organized rigid membrane structure". *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 301: E991-1003.
- Sun, K., Kusminski, C.M. y Scherer, P.E.** (2011). "Adipose tissue remodeling and obesity". *J. Clin. Invest.* 121: 2094-2101.
- Sun, Z., Gong, J., Wu, L. y Li, P.** (2013). "Imaging lipid droplet fusion and growth". *Methods Cell Biol.* 116: 253-268.
- Syu, L.J. y Saltiel, A.R.** (1999). "Lipotrassin: a novel docking protein for hormonesensitive lipase". *Mol. Cell.* 4: 109-115.
- Sztalryd, C., Xu, G., Dorward, H., Tansey, J.T., Contreras, J.A., Kimmel, A.R. y Londos, C.** (2003). "Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation". *J. Cell. Biol.* 161: 1093-1103.
- Szymanski, K.M., Binns, D., Bartz, R., Grishin, N.V., Li, W.P., Agarwal, A.K., Garg, A., Anderson, R.G. y Goodman, J.M.** (2007). "The lipodystrophy protein seipin is found at endoplasmic reticulum lipid droplet junctions and is important for droplet morphology". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104: 20890-20895.
- Tang, W.C., Lin, R.J., Liao, C.L. y Lin, Y.L.** (2014). "Rab18 facilitates Dengue Virus infection by targeting Fatty Acids Synthase to sites of viral replication". *J. Virol.* En prensa.
- Tansey, J.T., Sztalryd, C., Gruia-Gray, J., Roush, D.L., Zee, J.V., Gavrilova, O., Reitman, M.L., Deng, C.X., Li, C., Kimmel, A.R. y Londos, C.** (2001). "Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 6494-6499.
- Targett-Adams, P., Boulant, S. y McLauchlan, J.** (2008). "Visualization of double-stranded RNA in cells supporting hepatitis C virus RNA replication". *J. Virol.* 82: 2182-2195.
- Tarnopolsky, M.A., Rennie, C.D., Robertshaw, H.A., Fedak-Tarnopolsky, S.N., Devries, M.C. y Hamadeh, M.J.** (2007). "Influence of endurance exercise training and sex on intramyocellular lipid and mitochondrial ultrastructure, substrate use, and mitochondrial enzyme activity". *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292: R1271-1278.

Tauchi-Sato, K., Ozeki, S., Houjou, T., Taguchi, R. y Fujimoto, T. (2002). "The surface of lipid droplets is a phospholipidmonolayer with a unique fatty acid composition". *J. Biol. Chem.* 277: 44507-44512.

Tchkonia, T., Tchoukalova, Y.D., Giorgadze, N., Pirtskhalava, T., Karagiannides, I., Forse, R.A., Koo, A., Stevenson, M., Chinnappan, D., Cartwright, A., Jensen, M.D. y Kirkland, J.L. (2005). "Abundance of two human preadipocyte subtypes with distinct capacities for replication, adipogenesis, and apoptosis varies among fat depots". *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 288: E267-277.

Thiele, C. y Spandl, J. (2008) "Cell biology of lipid droplets". *Curr. Opin. Cell. Biol.* 20: 378-385.

Thiam, A.R., Farese, R.V. Jr. y Walther, T.C. (2013). "The biophysics and cell biology of lipid droplets". *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 14: 775-786.

Thoma, N.H., Iakovenko, A., Kalinin, A., Waldmann, H., Goody, R.S. y Alexandrov, K. (2001a). "Allosteric regulation of substrate binding and product release in geranylgeranyltransferase type II". *Biochemistry.* 40: 268-274.

Thoma, N.H., Niculae, A., Goody, R.S. y Alexandrov, K. (2001b). "Double prenylation by RabGGTase can proceed without dissociation of the mono-prenylated intermediate". *J. Biol. Chem.* 276: 48631-48636.

Thompson, B.R., Lobo, S. y Bernlohr, D.A. (2010). "Fatty acid flux in adipocytes: The in's and out's of fat cell lipid trafficking". *Moll. Cell. Endocrinol.* 318: 24-33.

Titorenko, V.I. y Mullen, R.T. (2006). "Peroxisome biogénesis: the peroxisomal endomembrane system and the role of the ER". *J. Cell. Biol.* 174: 11-17.

Tomas, E., Tsao, T.S., Saha, A.K., Murrey, H.E., Zhang, C.C., Itani, S.I., Lodish, H.F. y Ruderman, N.B. (2002). "Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 16309-16313.

Tomoda, H., Kumagai, H., Tanaka, H. y Omura, S. (1987). "F-244 specifically inhibits 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase". *Biochim. Biophys. Acta.* 922: 351-356.

Trayhurn, P. y Wood, I.S. (2004). "Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue". *Br. J. Nutr.* 92: 347-355.

Turró, S., Ingelmo-Torres, M., Estanyol, J.M., Tebar, F., Fernández, M.A., Albor, C.V., Gaus, K., Grewal, T., Enrich, C. y Pol, A. (2006). "Identification and characterization of associated with lipid droplet protein 1: A novel membrane-associated protein that resides on hepatic lipid droplets". *Traffic.* 7: 1254-1269.

Valiente, M., Andrés-Pons, A., Gomar, B., Torres, J., Gil, A., Tapparel, C., Antonarakis, S.E. y Pulido, R. (2005). "Binding of PTEN to specific PDZ domains contributes to PTEN protein stability and phosphorylation by microtubule-associated Serine/Threonine kinases". *J. Biol. Chem.* 280: 28936-28943.

- Vance, J.E.** (1990) "Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria". *J. Biol. Chem.* 265: 7248-7256.
- Vance, J.E. y Vance, D.E.** (2004). "Phospholipid biosynthesis in mammalian cells". *Biochem. Cell Biol.* 82: 113-128.
- van Harmelen, V., Skurk, T., Röhrig, K., Lee, Y.M., Halbleib, M., Aprath-Husmann, I. y Hauner, H.** (2003). "Effect of BMI and age on adipose tissue cellularity and differentiation capacity in women". *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 27: 889-895.
- van Helvoort, A., de Brouwer, A., Ottenhoff, R., Brouwers, J.F., Wijnholds, J., Beijnen, J.H., Rijnveld, A., van der Poll, T., van der Valk, M.A., Majoor, D., Voorhout, W., Wirtz, K.W., Elferink, R.P. y Borst, P.** (1999). "Mice without phosphatidylcholine transfer protein have no defects in the secretion of phosphatidylcholine into bile or into lung airspaces". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 11501-11506.
- Vázquez-Martínez, R., Cruz-García, D., Durán-Prado, M., Peinado, J.R., Castaño, J.P. y Malagón, M.M.** (2007). "Rab18 inhibits secretory activity in neuroendocrine cells by interacting with secretory granules". *Traffic.* 8: 867-882.
- Vendrell, J., El Bekay, R., Peral, B., García-Fuentes, E., Megia, A., Macías-González, M., Fernández Real, J., Jiménez-Gómez, Y., Escoté, X., Pachón, G., Simó, R., Selva, D.M., Malagón, M.M. y Tinahones, F.J.** (2011). "Study of the potential association of adipose tissue GLP-1 receptor with obesity and insulin resistance". *Endocrinology.* 152: 4072-4079.
- Vetter, I.R. y Wittinghofer, A.** (2001). "The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions". *Science.* 294: 1299-1304.
- Villena, J.A., Roy, S., Sarkadi-Nagy, E., Kim, K.H. y Sul, H.S.** (2004). "Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis". *J. Biol. Chem.* 279: 47066-47075.
- Virtanen, K.A., Lidell, M.E., Orava, J., Heglind, M., Westergren, R., Niemi, T., Taittonen, M., Laine, J., Savisto, N.J., Enerbäck, S. y Nuutila, P.** (2009). "Functional brown adipose tissue in healthy adults". *N. Engl. J. Med.* 360: 1518-1525.
- Virtue, S. y Vidal-Puig, A.** (2010). "Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome: an allostatic perspective". *Biochim. Biophys. Acta.* 1801: 338-349.
- Vock, R., Weibel, E.R., Hoppeler, H., Ordway, G., Weber, J.M. y Taylor, C.R.** (1996). "Design of the oxygen and substrate pathways. V. Structural basis of vascular substrate supply to muscle cells". *J. Exp. Biol.* 199: 1675-1688.
- Voelker, D.R.** (1990). "Characterization of phosphatidylserine synthesis and translocation in permeabilized animal cells". *J. Biol. Chem.* 265: 14340-14346.
- Voelker, D.R.** (2009). "Genetic and biochemical analysis of non-vesicular lipid traffic". *Annu. Rev. Biochem.* 78: 827-856.

Wajchenberg, B.L. (2000). "Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome". *Endocr. Rev.* 21: 697-738.

Walch-Solimena, C., Collins, R.N. y Novick, P.J. (1997). "Sec2p mediates nucleotide exchange on Sec4p and is involved in polarized delivery of post-Golgi vesicles". *J. Cell. Biol.* 137: 1495-1509.

Walker, A.K., Jacobs, R.L., Watts, J.L., Rottiers, V., Jiang, K., Finnegan, D.M., Shioda, T., Hansen, M., Yang, F., Niebergall, L.J., Vance, D.E., Tzoneva, M., Hart, A.C. y Naar, A.M. (2011). "A conserved SREBP-1/phosphatidylcholine feedback circuit regulates lipogenesis in metazoans". *Cell.* 147: 840-852.

Walther, T.C. y Farese, R.V. Jr. (2012). "Lipid droplets and cellular lipid metabolism". *Annu. Rev. Biochem.* 81: 687-714.

Wältermann, M., Hinz, A., Robenek, H., Troyer, D., Reichelt, R., Malkus, U., Galla, H.J., Kalscheuer, R., Stöveken, T., von Landenberg, P y Steinbüchel, A. (2005). "Mechanism of lipid-body formation in prokaryotes: how bacteria fatten up". *Mol. Microbiol.* 55: 750-763.

Wan, H.C., Melo, R.C., Jin, Z., Dvorak, A.M. y Weller, P.F. (2007). "Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies". *FASEB J.* 21: 167-178.

Wanders, R.J.A., Ferdinandusse, S., Brites, P. y Kemp, S. (2010a). "Peroxisomes, lipid metabolism and lipotoxicity". *Biochim. Biophys. Acta.* 1801: 272-280.

Wanders, R.J.A., Ruiter, J.P.N., Ijlst, L., Waterham, H.L. y Houten, S.M. (2010b). "The enzymology of mitochondrial fatty acid beta-oxidation and its application to follow-up analysis of positive neonatal screening results". *J. Inherit. Metab. Dis.* 33: 479-494.

Wanders, R.J. y Waterham, H.R. (2006). "Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited". *Annu. Rev. Biochem.* 75: 295-332.

Wang, J.W., Howson, J., Haller, E. y Kerr, W.G. (2001). "Identification of a novel lipopolysaccharide-inducible gene with key features of both A kinase anchor proteins and chs1/beige proteins". *J. Immunol.* 166: 4586-4595.

Wang, T.J., Larson, M.G., Levy, D., Benjamin, E.J., Leip, E.P., Wilson, P.W.F. y Vasan, R.S. (2004). "Impact of obesity on plasma natriuretic peptide levels". *Circulation.* 109: 594-600.

Wang, W., Sacher, M. y Ferro-Novick, S. (2000). "TRAPP stimulates guanine nucleotide exchange on Ypt1p". *J. Cell. Biol.* 151: 289-296.

Wang, X. y Kolattukudy, P.E. (1995). "Solubilization, purification and characterization of fatty acyl-CoA Reductase from duck uropygial gland". *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 208: 210-215.

Wang, H., Sreenevasan, U., Hu, H., Saladino, A., Polster, B.M., Lund, L.M., Gong, D.W., Stanley, W. y Sztalryd, C. (2011). "Perilipin 5, a lipid droplet-associated protein, provides physical and metabolic linkage to mitochondria". *J. Lipid. Res.* 52: 2159-2168.

- Wanner, C, Formanek, H. y Theimer, R.R.** (1981). "The ontogeny of lipid bodies (sphaerosomes) in plant cells : Ultrastructural evidence". *Planta*. 151: 109-123.
- Welte, M.A.** (2007). "Proteins under new management: lipid droplets deliver". *TRENDS Cell Biol.* 17: 363-369.
- Welte, M.A.** (2009). "Fat on the move: intracellular motion of lipid droplets". *Biochem. Soc. Trans.* 37: 991-996.
- White, M.F.** (2003). "Insulin signaling in health and disease". *Science*. 302: 1710-1711.
- White, U.A. y Stephens, J.M.** (2009). "Transcriptional factors that promote formation of white adipose tissue". *Mol. Cell. Endocrinol.* 318: 10-14.
- Whittle, A.J., Lopez, M. y Vidal-Puig, A.** (2011). "Using brown adipose tissue to treat obesity - the central issue". *Trends. Mol. Med.* 17: 405-411.
- Wickner, W. y Schekman, R.** (2008). "Membrane fusion". *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15: 658-664.
- Wilfling, F., Wang, H., Haas, J.T., Krahmer, N., Gould, T.J., Uchida, A., Cheng, J.X., Graham, M., Christiano, R., Fröhlich, F., Liu, X., Buhman, K.K., Coleman, R.A., Bewersdorf, J., Farese, R.V.Jr. y Walther, T.C.** (2013). "Mediate Lipid Droplet Growth by Relocalizing from the ER to Lipid Droplets". *Developmental Cell*. 24: 384-399.
- Wilfling, F., Thiam, A.R., Olarte, M.J., Wang, J., Beck, R., Gould, T.J., Allgeyer, E.S., Pincet, F., Bewersdorf, J., Farese, R.V.Jr. y Walther, T.C.** (2014). "Arf1/COPI machinery acts directly on lipid droplets and enables their connection to the ER for protein targeting". *Elife*. 3: e01607.
- Wolins, N.E., Skinner, J.R., Schoenfish, M.J., Tzekov, A., Bensch, K.G. y Bickel, P.E.** (2003). "Adipocyte protein S3-12 coats nascent lipid droplets". *J. Biol. Chem.* 278: 37713-37721.
- Wolins, N.E., Quaynor, B.K., Skinner, J.R., Schoenfish, M.J., Tzekov, A. y Bickel, P.E.** (2005). "S3-12, Adipophilin, and TIP47 package lipid in adipocytes". *J. Biol. Chem.* 280: 19146-19155.
- Wolins, N.E., Brasaemle, D.L. and Bickel, P.E.** (2006a). "A proposed model of fat packaging by exchangeable lipid droplet proteins". *FEBS Lett.* 580: 5484-5491.
- Wolins, N.E., Quaynor, B.K., Skinner, J.R., Tzekov, A., Croce, M.A., Gropler, M.C., Varma, V., Yao-Borengasser, A., Rasouli, N., Kern, P.A., Finck, B.N. y Bickel, P.E.** (2006b). "OXPAT/PAT-1 is a PPAR-induced lipid droplet protein that promotes fatty acid utilization". *Diabetes*. 55: 3418-3428.
- Wolinski, H., Kolb, D., Hermann, S., Koning, R.I. y Kohlwein, S.D.** (2011). "A role for seipin in lipid droplet dynamics and inheritance in yeast". 124: 3894-3904.
- Wong, J.T., Kim, P.T.W., Peacock, J.W., Yau, T.Y., Mui, A.L., Chung, S.W., Sossi, V., Doudet, D., Green, D., Ruth, T.J., Parsons, R., Verchere, C.B. y Ong, C.J.** (2007). "Pten (phosphatase and tensin homologue gene) haploinsufficiency promotes insulin hypersensitivity". *Diabetologia*. 50: 395-403.

- Wu, X., Motoshima, H., Mahadev, K., Stalker, T.J., Scalia, R. y Goldstein, B.J.** (2003). "Involvement of AMP-activated protein kinase in glucose uptake stimulated by the globular domain of adiponectin in primary rat adipocytes". *Diabetes*. 52: 1355-1363.
- Wu, J., Boström, P., Sparks, L.M., Ye, L., Choi, J.H., Giang, A.H., Khadekar, M., Virtanen, K.A., Nuutila, P., Schaart, G., Huang, K., Tu, H., van Marken Lichtenbelt, W.D., Hoeks, J., Enerbäck, S., Schrauwen, P. y Spiegelman, B.M.** (2012). "Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human". *Cell*. 150: 366-376.
- Xiong, B., Bayat, V., Jaiswal, M., Zhang, K., Sandoval, H., Charng, W.L., Li, T., David, G., Duraine, L., Lin, Y.Q., Neely, G.G., Yamamoto, S. y Bellen, H.J.** (2012). "Crag is a GEF for Rab11 required for rhodopsin trafficking and maintenance of adult photoreceptor cells". *PLOS Biol.* 10: e1001438.
- Xu, N., Zhang, S.O., Cole, R.A., McKinney, S.A., Guo, F., Haas, J.T., Bobba, S., Farese, R.V.Jr. y Mak, H.Y.** (2012). "The FATP1-DGAT2 complex facilitates lipid droplet expansion at the ER-lipid droplet interface". *J. Cell. Biol.* 198: 895-911.
- Yamaguchi, T., Omatsu, N., Matsushita, S. y Osumi, T.** (2004). "CGI-58 interacts with perilipin and is localized to lipid droplets. Possible involvement of CGI-58 mislocalization in Chanarin-Dorfman syndrome". *J. Biol. Chem.* 279: 30490-30497.
- Yamaguchi, T., Omatsu, N., Morimoto, E., Nakashima, H., Ueno, K., Tanaka, T., Satouchi, K., Hirose, F. y Osumi, T.** (2007). "CGI-58 facilitates lipolysis on lipid droplets but is not involved in the vesiculation of lipid droplets caused by hormonal stimulation". *J. Lipid. Res.* 48: 1078-1089.
- Yang, X., Matern, H.T., Gallwitz, D.** (1998). "Specific binding to a novel and essential Golgi membrane protein (Yip1p) functionally links the transport GTPases Ypt1p and Ypt31p". *EMBO J.* 17: 4954-4963.
- Yang, X., Heckmann, B.L., Zhang, X., Smas, C.M. y Liu, J.** (2013). "Distinct mechanisms regulate ATGL-mediated adipocyte lipolysis by lipid droplet coat proteins". *Mol. Endocrinol.* 27: 116-126.
- Yang, Z. y Klionsky, D.J.** (2010). "Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation". *Curr. Opin. Cell Biol.* 22: 124-131.
- Yang, R.Z., Lee, M.J., Hu, H., Pray, J., Wu, H.B., Hansen, B.C., Shuldiner, A.R., Fried, S.K., McLenithan, J.C. y Gong, D.W.** (2006). "Identification of omentin as a novel depot-specific adipokine in human adipose tissue: possible role in modulating insulin action". *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 290: E1253-1261.
- Yang, W., Thein, S., Wang, X., Bi, X., Ericksen, R.E., Xu, F. y Han, W.** (2014). "BCL2/seipin regulates adipogenesis through actin cytoskeleton remodeling". *Hum. Mol. Genet.* 23: 502-513.
- Ye, J., Li, J.Z., Liu, Y., Li, X., Yang, T., Ma, X., Li, Q., Yao, Z. y Li, P.** (2009). "Cideb, an ER- and lipid droplet-associated protein, mediates VLDL lipidation and maturation by interacting with apolipoprotein B". *Cell. Metab.* 9: 177-190.

Zehmer, J.K., Huang, Y., Peng, G., Pu, J., Anderson, R.G. y Liu, P. (2009). "A role for lipid droplets in inter-membrane lipid traffic". *Proteomics*. 9: 914-921.

Zerial, M. and McBride, H. (2001). "Rab proteins as membrane organizers". *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2: 107-117.

Zhang, Y., Wang, T., Xie, W., Wang-Fischer, Y.L., Getty, L., Han, J., Corkey, B.E. y Guo, W. (2005). "Regulation of acetyl CoA carboxylase and carnitine palmitoyl transferase-1 in rat adipocytes". *Obes. Res.* 13: 1530-1539.

Zhang, H.H., Halbleib, M., Ahmad, F., Manganiello, V.C. y Greenberg, A.S. (2002). "Tumor necrosis factor-alpha stimulates lipolysis in differentiated human adipocytes through activation of extracellular signal-related kinase and elevation of intracellular cAMP". *Diabetes*. 51: 2929-2935.

Zoeller, R.A., Lake, A.C., Nagan, N., Gaposchkin, D.P., Legner, M.A. y Lieberthal, W. (1999). "Plasmalogens as endogenous antioxidants: somatic cell mutants reveal the importance of the vinyl ether". *Biochem. J.* 338: 769-776.

Zweytick, D., Athenstaedt, K. y Daum, G. (2000). "Intracellular lipid particles of eukaryotic cells". *Biochim. Biophys. Acta.* 1469: 101-120.