



# Biología celular de los cuerpos lipídicos. Biogénesis, Acumulación y Metabolismo

Albert Herms Fiol

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

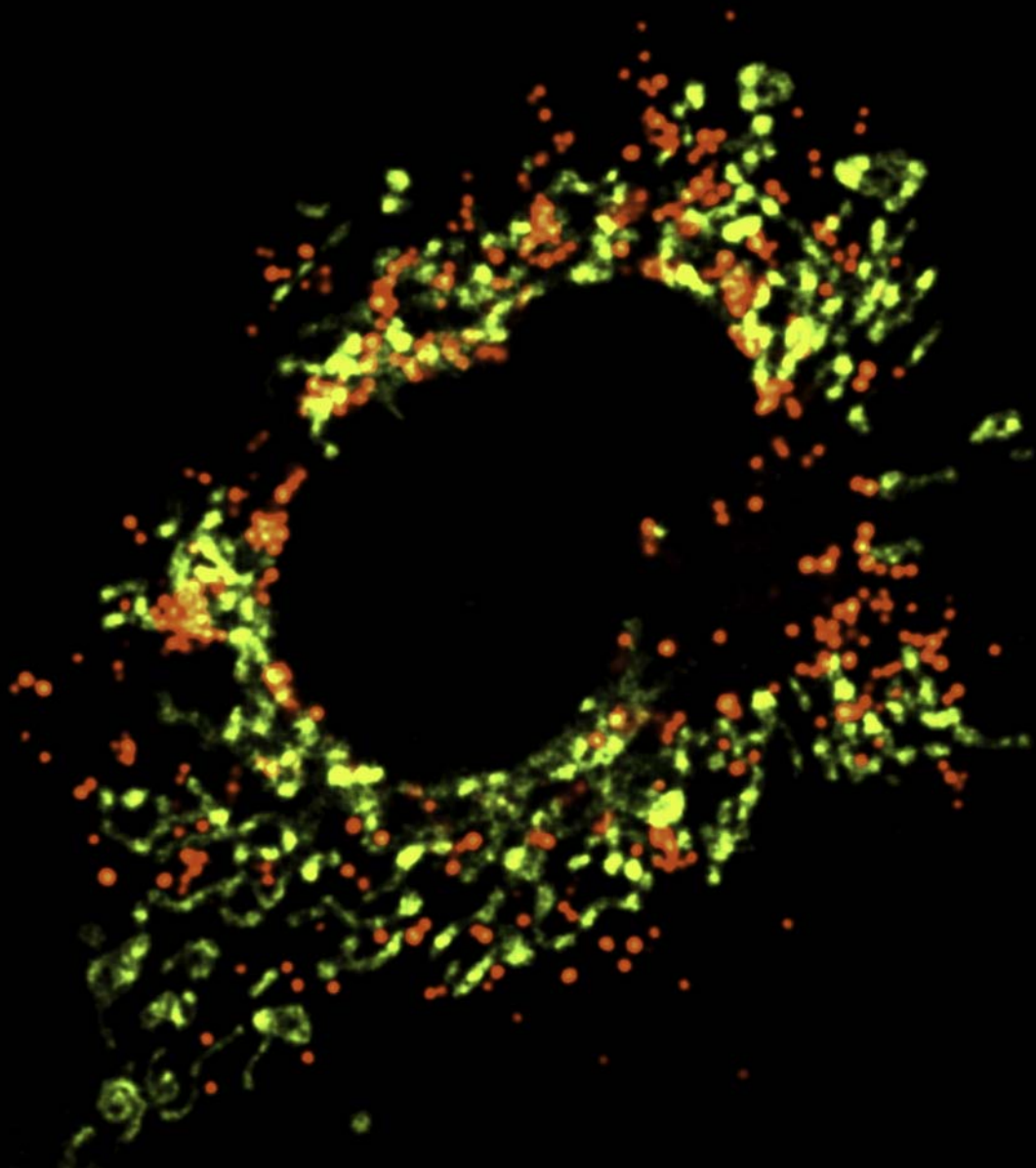
**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

# BIOLOGÍA CELULAR DE LOS CUERPOS LIPÍDICOS.

## BIOGÉNESIS, ACUMULACIÓN Y METABOLISMO

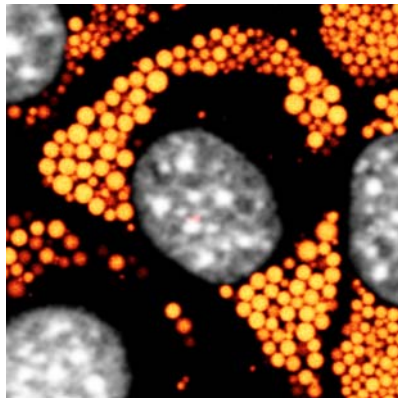
ALBERT HERMS FOL





# **BIOLOGÍA CELULAR DE LOS CUERPOS LIPÍDICOS.**

## **BIOGÉNESIS, ACUMULACIÓN Y METABOLISMO**





BARCELONA, FEBRERO 2014

PROGRAMA DE DOCTORADO DE BIOMEDICINA

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

BIOLOGÍA CELULAR DE LOS CUERPOS LIPÍDICOS.  
BIOGÉNESIS, ACUMULACIÓN Y METABOLISMO

MEMORIA PRESENTADA POR

ALBERT HERMS FIOI

PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN BIOMEDICINA

POR LA UNIVERSIDAD DE BARCELONA



ESTA TESIS HA SIDO REALIZADA BAJO LA SUPERVISIÓN DEL  
DR. ALBERT POL SOROLLA Y LA CO-DIRECCIÓN DEL  
DR CARLES ENRICH BASTÚS, DEL EQUIPO DE PROLIFERACIÓN Y  
SEÑALIZACIÓN CELULAR DEL IDIBAPS.





Als meus pares i al Jordi





*"If the brain were so simple we could understand it, we would be so simple we  
couldn't."*

*Lyall Watson*



## AGRAÏMENTS

Com se sol dir en totes les tesis, una tesi no es un treball individual sinó que prové de la col·laboració entre moltes persones que et permeten tirar endavant el teu projecte de recerca. Normalment aquesta afirmació es refereix al suport experimental o teòric que reps de les persones del teu grup, però en aquest cas m'agradaria estendre el sentit d'aquesta frase a tota la gent que amb el seu suport intel·lectual, emocional o lúdic m'han ajudat a tirar endavant aquests anys els experiments, però també la resta de la meva vida. Sense molts de vosaltres aquesta tesi no hagués estat possible. I com que aquestes pàgines no les corregirà ningú, però seran les úniques que molta gent llegirà, m'allargaré (ja no ve d'aquí).

Primer de tot a l'Albert Pol, voldria agrair-te acollir-me en el teu grup, després de tots aquests anys segueixo pensant que ets el millor *jefe* que hagués pogut tenir (ara ho puc dir, ja m'has signat la tesi). Gràcies per la llibertat de pensar i de fer experiments que sempre m'has donat, per la teva confiança en mi (a vegades excessiva des del meu punt de vista) i per sempre preocupar-te pel meu aprenentatge, corregint-me en tot allò que creies que podia fer millor. He après molt de veure't treballar, pensar i fer seminaris. També voldria agrair-te un cop més a tu i a la Marta A. el vostre suport i la vostra gran ajuda en els moments més difícils.

No puc escriure una paraula més sense parlar de la Marta Bosch. Gràcies per TOT. De tu he après a dissenyar, fer, combinar, a canviar *in situ* i interpretar experiments, per tant cadascuna de les figures d'aquesta tesi porta el teu segell (apart òbviament de les del primer tema, moltes de les quals son teves). *Interasantement*, voldria agrair-te especialment tot el temps que has invertit corregint-me la tesi, inclosos caps de setmana i també que t'hagis empenyat en salvar el meu tema. En tot aquest temps hem compartit moltes discussions, divagacions científiques eternes, cafès en moments d'histèria, celebracions, congressos, esquidades, passos petits i festes varies que han fet que, a més de mentora, et consideri una bona amiga.

Alba Fajardo!! Muchisimas gracias por tu enorme apoyo experimental y emocional durante todos estos años, son muchas conversaciones, fiestas y experimentos compartidos. Ha sido un inmenso placer trabajar a tu lado, contigo todo fluye! (incluso poner orden) espero volver a hacer-lo donde sea en un futuro, eres

muy buena. También quería agradecerte tus buenos consejos en todos los aspectos de mi vida (a poca gente le hago tanto caso) y por siempre estar ahí, eres lo más parecido a una hermana mayor que he tenido nunca.

Alba! (Llopis) el que t'hauria d'agrair ocuparia 300 pàgines més i no estem per talar més boscos, així que només t'agrairé aquí allò referent a la tesi. Pels que no ho sabeu, vaig començar a fer ciència perquè a l'Alba li feia vergonya anar sola a demanar per col·laborar al departament de Bio. cel·lular. Va ser la primera vegada que em vas empènyer a fer un pas endavant en la meua carrera, i a partir d'aquí n'hi han hagut moltes més. Totes. Gràcies per compartir tants moments d'apassionada conversa científica (en molts moments incompresa), tantes hores combinant passos petits i laboratori, per ser un referent en com fer experiments, en capacitat de treball, en honestedat científica i, més important, en intel·ligència; gràcies per no tenir cap problema per estar fins les 4 corregint-me la intro paraula per paraula i per tantíssimes altres coses. No m'imagino aquesta tesi sense tu, em fas ser millor científic (o intentar-ho). Ens ho hem passat molt bé. GRÀCIES.

Tuli!! l'altra padillena! M'ha encantat compartir aquests anys i whatsups amb tu i a través d'això poder-te conèixer. M'encanta el teu punt de vista original des de la innocència i honestedat científica portada fins a l'extrem, y els teus monòlegs improvisats. Gràcies per ser Tan bona! Portaré allà on vagi el mitocondri amb LD de feltre!

Hola Anna A! La teva energia i alegria contagioses fan que al lab tots els dies surti el sol (chipirón) (o ho sembli). *Importantemente*, m'has millorat la tesi amb les teves correccions i m'has donat un suport imprescindible durant aquests anys, especialment en aquest últim període d'escriptura, concerts, festivals, birres i inoblidables festes de Gràcia. Ets una crack. Moltes gràcies.

Gràcies a la resta de doctorands i tècnics que han fet del lab un lloc agradable on treballar. Iona! són molts anys de mirar a la poyata del davant i veure-t'hi (tot i canviar de lab!!). Ho trobaré a faltar allà on vagi. Gràcies pel teu riure contagiós, per les birres microscòpiques, pels menús culturals i les converses a cultius compartides, espero que segueixis rient-te de mi durant molts més anys. I molts ànims amb la escriptura! serà un plaer indescriptible poder estar amb tu el dia que et facis gran! Meri!! trajectòries paral·leles!! vam començar junts i marxem junts. Ha estat molt bé poder compartir aquests anys amb tu, el teu sentit de l'humor m'ha fet riure molt (fins i tot a vegades a risc de patir un accident) i me n'alegro Molt que les coses al final t'hagin sortit bé. T'ho has currat molt i t'ho mereixes. Ana G!! Qué Gran Fichaje. Me encanta tu ilusión por la ciencia y que conozcas a más gente en Barcelona que yo! Eres la última en llegar y en poco tiempo hemos

compartido muchos eventos, festivales (sí, en plural), birras, cenas, conciertos, bermuts, viajes a Zaragoza, okinawas, conversaciones científicas... Gracias por dejar de considerar-me un capullo i por saltar tanto (más que yo!!) al enterar-te de la aceptación de mi artículo!! Ivan! (sí, no eres doctorando pero casi jeje) muchas gracias por tus enseñanzas de diseño (sin las que esta tesis sería más fea) y tus chistes inacabables!! (i por el ternasco). Davit! Només ho escriuré un cop. València i home de bé (a vegades) podria ser. Gràcies per ser normal, aportes una estabilitat i bon ambient al lab molt necessaris. Ànims amb tot el que et queda fins a ser el Dr. Soriano! (avisa que ho vull celebrar amb tu). Sandra! Moltes gracias per tot! he rigut molt amb el teu humor verd jeje! María!! Gràcies per tots aquests anys compartits! sempre posant ordre. Espero que la teva evolució et porti a trobar allò que busques, passant o no per un pas de zebra! Maite!! La meva Històrica partner de poyata! Gràcies per compartir tants moments, mojitos, converses musicals, birres...m'encanta el teu sentit de l'humor absurd. Espero poder fer un baile de mierda amb tu per celebrar la tesi a Humea o on sigui. Muchas gracias también a los ex-doctorandos de mi grupo, a Adam por tantas conversaciones interesantes sobre politica, religión y otros temas, y a Elena! por tu vitalidad contagiosa y mil anécdotas, he reído mucho trabajando a tu lado.

I no podien faltar els habitants de l'"altre lab"! presents i passats! Del grup Neus, gràcies al Carles B. per tants anys compartits i converses científiques, ets un crack!! (espero que el dia que siguis jefe em fitxis!!). Amaia!! Zure irribarreagatik eta contajjosa zure barreagatik eskerrik asko, immunea izan arren zure begitxoetara oso ondo pasatu dut garagardoak eta zurekiko eztabaidak partekatuz, eta dragoncito-a paseatzera ateratzen duzun bezala ikusiz. Zori asko! Noe Paco! me lo he pasado muy bien con tu sentido del humor oscense! mucha suerte! També voldria agrair el somriure amb que sempre em reben l'Edu i la Sonia Brun.

Ni els doctorands i ex-doctorands d'altres grups innombrables. Dra. Alba G!! Ets la combinació perfecta de serietat científica/lingüística i desmadre festiu. Sempre disposada a apuntar-te a totes les histories diürnes i nocturnes! fet que ha fet que, a més de moltes converses de ciència, haguem compartit moltes vivències a altes hores i festes per recordar. Gràcies! Atilla!! Çok iyi, düştüm (platform) daha ilk günden itibaren ve daha. Sen harika bir imzalama ve her zaman ben çok iyi senin laboratuvar dışında paylaşılan anlar için teşekkür ederiz harcamak. Türkçe olarak yazmak, ve kimse anlamak için gibi Partnerinle Gülümsediğini görmek çok mutlu oldum sen söyle. Şanslar! David!! Gran conversador! Gracias por tus paellas legendarias y tu tranquilidad mediterranea! Me gustaria haber podido compartir más birras y actividades contigo! Siempre lo he pasado genial contigo, eres un tio muy interesante. Finalment a la resta de doctorands d'aquests grups

amb qui hem compartit videos de tesis y festes varies. Moltes gràcies a tots!

Voldria agrair a antics doctorands del lab com la Blanca, l'Ignasi, l'Albert Lu o la Paki haver-me servit de referents científics. També a la Mireia, amb qui no he compartit lab però sí moltes celebracions varies i converses interessants.

A les noves generacions d'estudiants de Master, gràcies per transmetre'ns aquella il·lusió dels inicis, especialment a la Celia (que m'ha hagut de suportar de papa-pato quisquillós) i a l'Elsa (sempre current i somrient alhora). Molta sort en el futur!

Finalment també voldria mostrar el meu agraïment a la resta de *jefes* que segueixen sent sensats per entre tots crear un lab on es combinen calçotades i paellades amb seminaris i molta feina experimental. Al Carles Rentero (sí, ets *jefe*) per sempre estar disposat a donar-me un cop de mà (no només alhora de beure mojitos) i per les teves preguntes als seminaris. Al Siscu per la teva actitud sempre disposat a solucionar-te problemes i el seu sentit de l'humor contagiós. Al Carles Enrich per ser un referent, perquè tot i l'experiència segueixes transmetent un interès per la ciència com el d'un estudiant de Master que acaba de començar. A la Neus Agell, per la teva ajuda en els pitjors moments i pel teu suport en tots els temes, tant científics com burocràtics, sempre amb un somriure. També a la Montse J. per la seva alegria contagiosa. I finalment a l'Eulalia, per sempre estar disposada a ajudar, per fer que les coses funcionin i ser un pilar del lab fins i tot en els moments més difícils.

A les noies del confo! a l'Anna B, l'Elisenda i especialment a la Maria Calvo, a qui he arribat a molestar en plenes vacances familiars per la muntanya per problemes amb l'SP5. Moltes gràcies per la vostra ajuda! (i per les calçotades). També gràcies a les noies del FACS.

Em vaig iniciar en la ciència a Bellvitge i voldria mostrar el meu agraïment a la Mireia Martín-Satué (la meva primera mama pato), al Joan Blasi i a tota la gent de Bellvitge que em van acollir tan bé.

Apart de les qüestions científiques voldria parlar de tota la gent de fora del lab que m'ha ajudat en aquesta etapa:

A l'Anna Pou per entendre'm i donar-me un suport i estabilitat emocional crítics durant la major part d'aquests anys. Moltes gràcies per tot, espero que et vagi tot molt bé a partir d'ara.

A tot el grup de Biofrikis, per tots els Terres, esquiades, festes, dinars, sales, futbol, sopars...compartits (on sovint he arribat tard), que sempre em fan sentir molt còmode. Espero que seguim mantenint això tot i la distància. Moltes gràcies a tots! En especial al Taxu per fer-me tocar sempre de peus a terra i al Gerard, perquè formes part dels Biofrikis, dels de la Uni i de les persones a qui primer dic algo quan tinc un problema sentimental. Gràcies per tot el teu suport quan ho he necessitat, per les mil converses interessants, i per expressar sempre les idees més besties que estic pensant i emportar-te els pals!!

Al grup d'amics de l'institut (i extres), que encara que quedem poc sempre em sento com a casa i em fan sortir de la bombolla científica per un moment. Especialment voldria agrair al Guillem el seu suport en tot moment (fins i tot amb una frontera enmig!), i tantes experiències compartides que m'han fet ser com sóc.

Al grup d'amics de la Uni (alguns retrobats fa poc per sants!), amb qui hem compartit una etapa molt important, a més de calçotades i mil festes, especialment als recentment doctors Pagès, Demajo i Sala, gent brillant i grans referents científics i/o polítics, amb qui he passat molt bons moments.

Finalment vull agrair a la meva família el seu suport durant tots aquests anys. A tots els tiets, cosins i fills de cosins que fan que els retrobaments tant a Avinyó com a Santander o a Mallorca sempre siguin tan divertits. A l'Abuela, que sempre m'ha donat suport (ara deu resar per mi) i m'ha ensenyat tot el que sé de plantes (apart de la carrera). A la laia per sempre preocupar-se per mi i per tots els seus nets més que per ella mateixa i l'Avi per ser el que voldria ser jo als 94 anys, mantenint una intel·ligència i memòria per tot tipus de detalls admirable. Gràcies per transmetre'm la il·lusió per la feina de laboratori.

Al Jordi perquè m'has hagut de suportar com a germà gran i això no es gens fàcil. La teva capacitat de superació es increïble, i sé que acabaràs sent un gran arqueòleg només que creguis una dècima part en tu mateix del que jo hi crec.

I per últim, i més important, als meus Pares. El fet que escrigui això a l'habitació de Sant Feliu es un reflex de l'ambient estable que heu creat i que m'ha fet ser com sóc (apart de la genètica). Aquesta tesi evidentment no existiria sense l'exigència i la capacitat de treball que m'heu inculcat, però tampoc sense el vostre suport i afecte durant tot aquest temps. Gràcies per ser un dels pilars que estableixen la meva vida desordenada.

Moltes gràcies a tots!





ABREVIATURAS	25
INTRODUCCIÓN	27
<b>1. Los cuerpos lipídicos en diferentes organismos</b>	<b>31</b>
<b>2. Composición de los cuerpos lipídicos</b>	<b>33</b>
2.1 Componentes lipídicos de los CLs	34
2.1.1 Monocapa externa de lípidos polares	34
2.1.2 Núcleo de lípidos neutros	37
2.2 Proteínas residentes en CLs	41
2.2.1 Proteoma de los CLs	42
2.2.2 Proteínas abundantes en los CLs	43
2.2.3 Direccionamiento de proteínas a los CLs	52
2.2.4 Acumulación y degradación de proteínas en los CLs	56
2.3 ARN en los CLs	57
<b>3. Formación de los cuerpos lipídicos</b>	<b>59</b>
3.1 Modelos de biogénesis de CLs	59
3.1.1 Acumulación de lípidos en la membrana del RE	59
3.1.2 Modelo del “huevo y la copa”	62
3.1.3 Acumulación de TAG en vesículas	63
3.1.4 Biogénesis de CLs en la membrana plasmática	63
3.2 Maduración de los CLs	64
3.2.1 Incorporación de ácidos grasos a los CLs	64
3.2.2 Fusión entre CLs	65
3.3 Otros reguladores de la acumulación de CLs	68
<b>4. Acumulación de cuerpos lipídicos y funciones asociadas</b>	<b>71</b>
4.1 Exceso de ácidos grasos y lipotoxicidad	71
4.1.1 Lipotoxicidad de los AGs	71
4.1.2 Efecto protector del AO sobre la lipotoxicidad	74
4.2 Estrés celular	75
4.2.1 Estrés de retículo endoplasmático	76
4.2.2 Estrés osmótico	76

4.2.3 Ayuno de nutrientes	77
4.3 Disfunción mitocondrial	77
4.4 Hipoxia	78
4.5 Apoptosis	78
4.6 Patógenos	79
4.6.1 Infecciones víricas	79
4.6.2 Infecciones bacterianas	80
4.6.3 Parásitos	81
<b>5. Dinámica de los cuerpos lipídicos</b>	<b>83</b>
5.1 Movimiento de los CLs	83
5.2 Interacción con otros orgánulos	85
5.2.1 Retículo endoplasmático	86
5.2.2 Endosomas	88
5.2.3 Mitocondrias	88
5.2.4 Peroxisomas	90
5.2.5 Lisosomas, fagosomas y autofagosomas	90
<b>6. Metabolismo de los cuerpos lipídicos</b>	<b>91</b>
6.1 Lipólisis citosólica	91
6.1.1 Mecanismo general	92
6.1.2 Lipólisis en adipocitos	93
6.1.3 Lipólisis en tejidos oxidativos	96
6.2 Lipólisis en el retículo endoplasmático	98
6.2.1 Secreción de lipoproteínas	98
6.2.2 Secreción de colesterol en macrófagos	99
6.3 Autofagia de CLs o Lipofagia	100
6.4 Destino metabólico de los ácidos grasos	101
6.4.1 Re-esterificación en CLs	102
6.4.2 $\beta$ -oxidación mitocondrial	103
6.4.3 Síntesis de fosfolípidos	104
6.4.4 Secreción como AGs libres o lipoproteínas	104
6.4.5 Señalización celular	105
<b>7. Funciones de los cuerpos lipídicos en diferentes tejidos</b>	<b>107</b>

OBJETIVOS	113
RESULTADOS	117
<b>1. Papel de la caveolina-1 en el metabolismo</b>	<b>121</b>
1.1 La deficiencia de caveolina-1 genera células dependientes de glucosa	121
1.2 La activación del metabolismo mitocondrial causa apoptosis por estrés oxidativo en células CAV1 <sup>-/-</sup>	123
1.3 Las células CAV1 <sup>-/-</sup> muestran una alteración mitocondrial	125
1.4 La disfunción mitocondrial en células CAV1 <sup>-/-</sup> es debida a un mayor contenido de colesterol mitocondrial	126
<b>2. Estudio de la biogénesis de cuerpos lipídicos y el papel de ACSL3 en este proceso</b>	<b>131</b>
2.1 Caracterización de HPos como marcador de CLs	131
2.2 El HPos permite la detección de una etapa muy temprana de la formación de CLs	136
2.3 Análisis de la incorporación de proteínas a los CLs emergentes	138
2.4 La localización de ACSL3 en los CLs nacientes precede a la acumulación de lípidos	141
2.5 ACSL3 es necesaria para la biogénesis de los CLs	142
2.6 ACSL3 es necesaria para la acumulación de CLs maduros	144
2.7 Contribución de la actividad de ACSL3 en la acumulación de CLs	146
<b>3. Análisis de los factores que regulan la acumulación de cuerpos lipídicos</b>	<b>149</b>
3.1 Factores que modulan la acumulación de CLs en distintos modelos celulares	152
3.2 Heterogeneidad en la acumulación de CLs en el hígado	155
3.2.1 Análisis de la heterogeneidad en la acumulación de CLs	157
3.2.2 Factores que afectan a la heterogeneidad en el contenido de CLs durante la carga de CLs	159
3.2.3 Factores que afectan a la heterogeneidad en el contenido de CLs durante su metabolización.	160
3.2.4 La heterogeneidad en la acumulación de CLs es un proceso estocástico	163

3.2.5 La subpoblación de células con alto contenido en CLs es una ventaja para la población	165
3.2.6 Las células con mayor contenido en CLs captan más AGs y reducen la acumulación de CLs en el resto de células	168
3.2.7 Las células con más CLs pueden aportar AGs al resto de la población	168

#### **4. Efecto de la localización de los cuerpos lipídicos sobre su metabolización** **173**

4.1 Los CLs retrasan la parada en el ciclo celular y la apoptosis inducidas por la falta de glucosa	176
4.2 La falta de glucosa promueve la dispersión de los CLs en fibroblastos	178
4.3 Caracterización del movimiento de los CLs en condiciones de descarga	180
4.4 El movimiento y la dispersión de los CLs dependen de microtúbulos	182
4.5 La presencia de glucosa promueve el uso de los CLs para la síntesis de fosfolípidos	184
4.6 El ayuno de glucosa promueve el uso mitocondrial de los AGs de los CLs	185
4.7 El ayuno de glucosa promueve la interacción entre CLs y mitocondrias	187
4.8 La interacción entre CLs y mitocondrias depende de microtúbulos	190
4.9 La dispersión y consumo de los CLs en ausencia de glucosa requiere de la actividad mitocondrial	192
4.10 AMPK y PKA regulan la dispersión y el movimiento de CLs	194
4.11 El ayuno de glucosa modifica la dinámica de los microtúbulos y la estabilización de éstos provoca dispersión de CLs	198
4.12 Efecto de la acetilación de la tubulina sobre la dispersión de los CLs	200
4.13 La dispersión de los CLs depende de la detirosinación de los microtúbulos	202

## **DISCUSIÓN** **205**

### **1. Papel de la caveolina-1 en el metabolismo** **209**

1.1 La deficiencia de caveolina-1 incrementa el colesterol mitocondrial reduciendo la eficiencia en la respiración mitocondrial	209
1.2 Mecanismo por el que la falta de caveolina-1 incrementa el colesterol mitocondrial	211
1.3 Consecuencias fisiológicas de la deficiencia de caveolina-1	213

<b>2. Estudio de la biogénesis de cuerpos lipídicos y el papel de ACSL3 en este proceso</b>	<b>215</b>
2.1 El péptido HPos es un buen marcador de la biogénesis de CLs	215
2.2 El péptido HPos revela la existencia de CLs pre-existentes y la formación de CLs emergentes en el RE	216
2.3 La biogénesis de los CLs es un proceso secuencial y sincronizado	217
2.4 ACSL3 es necesaria para la acumulación de CLs	218
2.5 La actividad de ACSL3 depende del dominio <i>Gate</i>	<b>219</b>
2.6 Posible función de ACSL3 independiente de su actividad	219
2.7 Implicaciones de ACSL3 en el modelo de biogénesis de CLs	220
<b>3. Análisis de los factores que regulan la acumulación de cuerpos lipídicos</b>	<b>223</b>
3.1 Factores que modulan la acumulación de CLs en distintos modelos celulares	223
3.1.1 Las células AML12 acumulan más CLs	223
3.1.2 El balance entre vías metabólicas modula la acumulación de CLs en diferentes tipos celulares	224
3.2 Heterogeneidad en la acumulación de CLs en hígado	226
3.2.1 La heterogeneidad en la acumulación de CLs protege las células de la lipotoxicidad	226
3.2.2 La heterogeneidad en la acumulación de CLs estaría causada por la estocástica en la expresión génica	228
3.2.3 Factores intracelulares que modulan la heterogeneidad	229
3.2.4 Heterogeneidad en el contenido de CLs en diferentes contextos fisiológicos	230
3.2.5 Implicaciones de la heterogeneidad en la esteatosis hepática	231
<b>4. Efecto de la localización de los cuerpos lipídicos sobre su metabolización</b>	<b>233</b>
4.1 La disponibilidad de glucosa regula la localización y el movimiento de los CLs	234
4.2 La ausencia de nutrientes promueve la interacción entre CLs y mitocondrias	235
4.3 La actividad mitocondrial modula la dispersión de los CLs	236
4.4 Las quinasas de respuesta a estrés energético regulan la dispersión de los CLs	237
4.5 El ayuno de glucosa modifica la dinámica de los microtúbulos y como consecuencia la localización de los CLs	238

4.6 Relación entre la modificación posttraduccional de los microtúbulos y la localización de los CLs	239
4.7 Modelo propuesto	241
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>243</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>247</b>
<b>1. Modelos celulares y proliferación</b>	<b>249</b>
1.1 Líneas celulares usadas	249
1.2 Aislamiento de hepatocitos	250
1.3 Tinción con DDAO-SE para producir células indicadoras	250
1.4 Contaje celular en cámara de Neubauer	250
1.5 Sincronización de las células en diferentes fases del ciclo	251
<b>2. Preparación de productos</b>	<b>252</b>
2.1 Drogas usadas y su preparación	252
2.2 Conjugación de ácido oleico y ácido palmítico con BSA	253
<b>3. Transfección</b>	<b>254</b>
3.1 Transfección de ADN en células	254
3.2 Transfección de ADN con lipofectamina	255
3.3 Transfección de siRNA con lipofectamina	255
<b>4. Microscopía</b>	<b>256</b>
4.1 Análisis por microscopía de las células transfectadas	256
4.2 Detección de CLs por microscopía mediante la tinción de Nile red en células fijadas	256
4.3 Microscopía confocal de células <i>in vivo</i>	258
4.4 Videomicroscopía de contraste de fases	259
4.5 Análisis de las puntas de los microtúbulos	259
4.6 Inmunocitoquímica	260
<b>5. Aislamiento de orgánulos</b>	<b>261</b>

5.1 Purificación de mitocondrias	261
5.2 Fraccionamiento celular por gradientes de densidad	262
<b>6. Bioquímica</b>	<b>262</b>
6.1 Cuantificación de proteína por el método de Bradford	262
6.2 Análisis de la expresión de proteínas por <i>western blot</i>	263
6.3 Cromatografía en capa fina	264
6.4 Ensayo de actividad ACSL	265
6.5 Análisis de la secreción de lactato al medio y del contenido de TAG	265
<b>7. Ensayos de metabolismo</b>	<b>266</b>
7.1 Respirimetría de alta resolución	266
7.2 Ensayo de oxidación de glucosa	267
7.3 Ensayo de $\beta$ -oxidación de AGs del medio	268
7.4 Acumulación de AGs marcados en los CLs	269
7.5 Ensayo de $\beta$ -oxidación de los AGs procedentes de CLs	269
7.6 Ensayo de paso de AGs entre células	270
<b>8. Citometría de flujo</b>	<b>271</b>
8.1 Análisis del perfil de ciclo	271
8.2 Análisis de la apoptosis	271
8.3 Análisis del potencial de membrana	272
8.4 Análisis del estrés oxidativo	273
8.5 Análisis de la cantidad de CLs	273
8.6 Análisis de la captación de AGs	275
8.7 Separación de células con diferente contenido de CLs ( <i>cell sorting</i> )	275
8.8 Análisis de la fluidez de la membrana mitocondrial	277
<b>REFERENCIAS</b>	<b>279</b>
<b>ANEXO</b>	<b>313</b>





# ABREVIATURAS

AO	ácido oleico
acil-CoA	acil-Coenzima A
AE	ácido esteárico
AG(s)	ácido(s) graso(s)
AP	ácido palmítico
CE	ésteres de colesterol (siglas en inglés)
CL(s)	cuerpo(s) lipídico(s)
DAG	diacilglicéridos
emCLs	cuerpos lipídicos emergentes
HPos	péptido con una secuencia Hidrofóbica y otra Positiva
HNeu	péptido con una secuencia Hidrofóbica y otra Neutra
MAG	monoacilglicéridos
MAM	regiones del retículo asociadas a mitocondrias (siglas en inglés)
PA	ácido fosfatídico (siglas en inglés)
PC	fosfatidilcolina (siglas en inglés)
PE	fosfatidiletanolamina (siglas en inglés)
PI	fosfatidilinositol (siglas en inglés)
preCLs	cuerpos lipídicos pre-existentes
PS	fosfatidilserina (siglas en inglés)
%rCV	coeficiente robusto de variación (siglas en inglés)
RE	retículo endoplasmático
ROS	especies reactivas de oxígeno (siglas en inglés)
TAG	triacilglicéridos
VLDL	lipoproteínas de muy baja densidad (siglas en inglés)



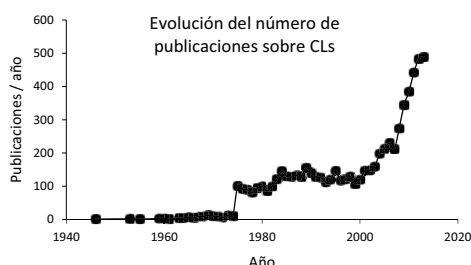


---

# INTRODUCCIÓN



Los cuerpos lipídicos (CLs) son los principales orgánulos encargados del almacén de lípidos, siendo el mayor reservorio energético de las células. Están formados por un núcleo de lípidos neutros hidrófobos separados del citoplasma por una monocapa de fosfolípidos en la que se anclan determinadas proteínas. Fueron descritos a finales del siglo XIX por Hanstein, Altmann y Wilson en diferentes publicaciones y originalmente fueron llamados liposomas o microsomas. Desde entonces estos orgánulos han sido denominados de múltiples maneras: cuerpos lipídicos, gotas lipídicas, adiposomas, gránulos, inclusiones lipídicas, triglicéridos intramiocelulares, partículas lipídicas, oleosomas o cuerpos de aceite [1]. Inicialmente fueron considerados como simples orgánulos estáticos únicamente implicados en el almacén lipídico y básicamente importantes en tejidos especializados como el tejido adiposo. No obstante, la presencia de CLs no es exclusiva de tejidos especializados como el adiposo, sino que sucede en todas las células eucariotas y en muchos procariontes. En la última década el número de estudios sobre estos orgánulos ha incrementado exponencialmente (Figura 1 de la Introducción), especialmente desde el descubrimiento de la perilipina, la primera proteína residente en CLs descrita, en el laboratorio de C. Londos en 1991[2].



**Figura 1. Evolución del número de publicaciones sobre CLs.** Resultado de la búsqueda: (“lipid droplet”) OR (“lipid body”) OR (“lipid bodies”) OR (adiposomas) OR (“lipid particle”) OR (“lipid inclusion”) OR (IMTG) OR (“lipid droplets”) en la base de datos Pubmed.

Poniendo de manifiesto que se trata de orgánulos complejos, recientemente se ha descrito la implicación de los CLs en múltiples procesos como el metabolismo energético, la síntesis de lípidos y hormonas, la señalización celular, el almacén y la degradación de proteínas, la secreción de lipoproteínas, la respuesta inflamatoria, el ciclo vital de algunos patógenos, el cáncer o la longevidad. Además, la acumulación excesiva de CLs es una característica común en múltiples patologías relacionadas con la obesidad como el síndrome metabólico, la esteatosis hepática y la aterosclerosis [3], subrayando la relevancia del estudio de la biología de estos orgánulos.



### LOS CUERPOS LIPÍDICOS EN DIFERENTES ORGANISMOS

Como se ha comentado anteriormente, todas las células eucariotas tienen la capacidad de sintetizar CLs, así como muchas bacterias y algunas arqueas. Tan elevada conservación indicaría que la capacidad de almacenar lípidos neutros debió aparecer en momentos muy iniciales de la evolución de la vida.

La mayoría de **bacterias** y algunas **arqueas** pueden sintetizar CLs en la membrana plasmática, usándolos mayoritariamente para el acúmulo de polihidroxilalcanoatos (PHA), aunque algunas acumulan triglicéridos (TAG). Las bacterias utilizan estos lípidos para el aporte energético en situación de escasez de nutrientes. Además, la capacidad de acumular PHA en procariotas es de interés comercial para su potencial uso en la síntesis de polímeros como componentes de implantes médicos y algunos plásticos [1, 4].

En los organismos eucariotas, los CLs ejercen múltiples funciones. **Protistas** ciliados del género *Tetrahymena* acumulan CLs para sintetizar fosfolípidos [1]. Estos orgánulos además son esenciales en el ciclo vital de protistas parásitos causantes de enfermedades como la tripanosomiasis o la malaria [1, 5].

Todas las **plantas**, incluso las algas unicelulares, pueden acumular CLs en el citoplasma, estando éstos implicados en la polinización, en la germinación de las semillas y también en el desarrollo de los meristemas y su latencia durante el invierno. Los cloroplastos, además de realizar la fotosíntesis, también participan en la síntesis *de novo* de ácidos grasos (AGs). Curiosamente estos orgánulos acumulan unas estructuras similares a CLs llamadas plastoglobulos que suelen contener TAG, ésteres de colesterol y pigmentos lipofílicos como carotenos, actuando como reservorio de estos pigmentos para la adaptación rápida a entornos cambiantes [1]. La modificación genética de la acumulación de CLs en plantas o algas marinas es de gran interés para la producción de alimentos [6] o de biocombustibles [1, 7, 8].

En **hongos** parásitos de plantas, los CLs sirven para almacenar nutrientes captados desde éstas y transportarlos a lo largo del micelio, aunque también participarían en la detección de la gravedad [1, 9]. En algunas levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, frecuentemente usadas como organismo modelo para el estudio de los CLs, estos orgánulos son usados para la síntesis de fosfolípidos necesaria para la proliferación en fase exponencial y, además, se acumulan en



fase estacionaria evitando la toxicidad de los AGs [8]. Otras especies de levadura como *Yarrowia lipolytica* pueden acumular lípidos hasta llegar al 70% de su biomasa siendo de uso potencial para la producción de biocombustibles.

Los CLs tienen un papel relevante en el desarrollo en insectos como *Drosophila melanogaster*, donde se acumulan durante el desarrollo de la larva para luego metabolizarse durante la metamorfosis. En este proceso los CLs también sirven como almacén transitorio de histonas necesarias para el rápido ciclo de mitosis que se suceden en la embriogénesis. En general el proteoma de los CLs de *D. melanogaster* es bastante similar al de los mamíferos, indicando una conservación a lo largo de la evolución que permite su uso como organismo modelo en determinadas enfermedades metabólicas [1, 10].

En otro organismo modelo, como el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, debido a la ausencia de tejido adiposo, el almacén de lípidos se lleva a cabo en el intestino, que también ejerce las funciones del hígado. En las células intestinales, el metabolismo de lípidos se da en los CLs y también en orgánulos relacionados con los lisosomas (LRO, de sus siglas en inglés), en algunos casos confundidos con los CLs debido al protocolo de tinción con Nile red usado [11-13].

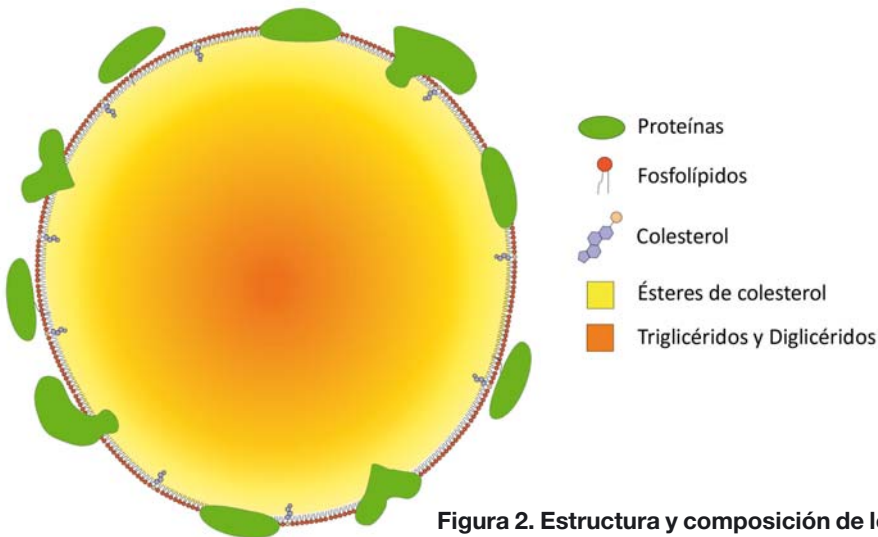
En **mamíferos**, además de las funciones comunes de los CLs en todas las células eucariotas, estos orgánulos realizan funciones adicionales y específicas en los diferentes tejidos. Este hecho se refleja en una mayor complejidad y redundancia funcional en los mecanismos de regulación de los CLs. Los principales órganos de almacén de lípidos en mamíferos son los tejidos adiposos blanco y marrón, aunque también se acumulan CLs de forma importante en las células esteroideogénicas para la síntesis de hormonas, en el epitelio mamario, para la producción de leche, en el hígado y los enterocitos, para la producción de lipoproteínas y el metabolismo de lípidos, y en leucocitos, para la síntesis de eicosanoides.

En conclusión, los CLs son orgánulos muy conservados evolutivamente, con una función común como almacén de lípidos en las diferentes especies, aunque con diferentes implicaciones de esta función según el organismo y el tipo celular.

### COMPOSICIÓN DE LOS CUERPOS LIPÍDICOS

Los CLs son los únicos orgánulos intracelulares descritos hasta el momento delimitados por una sola monocapa de fosfolípidos polares y anfipáticos, hecho que les permite tener un interior hidrofóbico donde poder almacenar lípidos neutros, en una estructura análoga a la de las lipoproteínas. En la monocapa de fosfolípidos se anclan las proteínas encargadas de regular su función (Figura 2).

Estos orgánulos son esféricos y su número y tamaño difiere mucho entre las diferentes células e incluso dentro del mismo tipo celular. En células no adipocitarias suelen tener un diámetro de entre 0,1-5 $\mu\text{m}$ , aunque en hígados esteatóticos pueden alcanzar los 10 $\mu\text{m}$ . Por otro lado, los adipocitos blancos cuentan con un gran CL de 100-150 $\mu\text{m}$  de diámetro, ocupando la práctica totalidad de su citoplasma [3, 8, 14, 15].



Los CLs de mamíferos son mayoritariamente citosólicos, aunque recientemente se ha descrito la presencia de cierta clase de CLs en el núcleo de hepatocitos [16-18] de relevancia funcional desconocida.

La composición de lípidos y proteínas de los CLs en un determinado contexto celular es clave para explicar el comportamiento y la función de estos orgánulos. Por ello, a continuación, se detallan los diferentes componentes, esencialmente lipídicos y proteicos, que forman los CLs.

## 2.1 Componentes lipídicos de los CLs

La polaridad de los lípidos constituyentes de los CLs determina su localización dentro de estos orgánulos. Los lípidos polares, anfipáticos, forman la monocapa externa, mientras que el núcleo interno está compuesto por lípidos apolares, de carga neutra.

### 2.1.1 Monocapa externa de lípidos polares

La composición de la monocapa de fosfolípidos de los CLs difiere de la de membranas celulares como el retículo endoplasmático (RE), la membrana plasmática o el aparato de Golgi [19]. A pesar de su aparente simplicidad, esta monocapa está formada por más de 160 fosfolípidos diferentes [20].

La composición de fosfolípidos de monocapa externa de los CLs varía según el organismo. Tanto en células de mamífero como de levadura el fosfolípido mayoritario es la **fosfatidilcolina** (PC) llegando hasta el 60% del total de fosfolípidos, seguido de la fosfatidiletanolamina (PE) (hasta un 24%), fosfatidilinositol (PI) y de forma más minoritaria por otros fosfolípidos como el ácido fosfatídico (PA), la fosfatidilserina (PS), lisofosfolípidos como la lisofosfatidilcolina y la lisofosfatidiletanolamina, y éter-fosfolípidos como la éter-PC o la éter-PE. También se ha descrito la presencia de esfingomiélna en fibroblastos y adipocitos, aunque de forma menos abundante que en otros compartimentos. Además de fosfolípidos la monocapa podría contener otras especies lipídicas como diacilglicerol (DAG) y colesterol libre, aunque la localización de éstos es controvertida, pudiendo encontrarse en el núcleo interno [8, 14, 20-22].

La principal función de la monocapa de fosfolípidos parece ser la **regulación del tamaño** de los CLs y evitar la posible fusión entre éstos, que frecuentemente se encuentran muy próximos entre sí formando racimos. En este sentido, fosfolípidos con forma cilíndrica como la fosfatidilcolina (PC) parecen evitar la fusión entre CLs. Dado que se ha descrito que la PC evita la fusión entre CLs *in vitro* y además células deficientes en este fosfolípido tienen CLs más grandes [23-25], aunque el diferente tamaño también podría deberse a una menor lipólisis. Por el contrario, ligeros incrementos en PA o PE, fosfolípidos con forma de cono, facilitan la fusión de CLs [26]. Además, el PA promueve la fusión de membranas

mediada por proteínas SNARE, que también se han implicado en procesos de fusión entre CLs [27, 28].

Otro posible papel de los fosfolípidos en la superficie de los CLs sería la **regulación de la lipólisis**. Por un lado, se ha descrito que la exposición al exterior de los TAG en CLs recubiertos por fosfatidiletanolamina es mucho mayor que en aquellos envueltos por fosfatidilcolina, quedando más disponibles a la acción de las lipasas [29]. Por otro lado, la reducción de la síntesis de fosfatidilcolina disminuye el reclutamiento en los CLs del regulador de la lipólisis Plin1/perilipina (explicado más adelante), incrementando la lipólisis basal [30].

En los CLs, para cada clase de fosfolípido (PC, PE, PS...) existen multitud de variantes según los AGs que forman parte de ellas [20]. Además del efecto de las diferentes especies de fosfolípidos, la actividad lipolítica también vendría regulada por el grado de saturación de los AGs que componen estos fosfolípidos. Se ha propuesto que una mayor proporción de cadenas de AGs saturadas aumenta la rigidez de la monocapa de fosfolípidos, hecho que correlaciona con un mayor reclutamiento de lipasas y actividad lipolítica y [31]. La composición de AGs de los fosfolípidos de los CLs viene regulada por la expresión de esteroil-desaturasas y de elongasas [32]. El grado de saturación de los AGs de estos fosfolípidos está muy regulado; por ejemplo, se ha descrito que cambia durante el proceso de diferenciación de los adipocitos y además, en el mismo adipocito es diferente entre los diferentes CLs, correlacionando con el tamaño de éstos [32].

Como hemos comentado, el principal fosfolípido presente en los CLs es la fosfatidilcolina. Las células de mamífero tienen 3 vías principales de síntesis o modificación de este fosfolípido:

### ***Vía de Kennedy o síntesis de novo***

La vía de Kennedy es la vía mayoritaria y más extendida de síntesis de fosfatidilcolina (PC) en la mayoría de células de mamífero. Esta vía consiste en la reacción seriada de la colina quinasa, la CTP:fosfocolina citidil-transferasa (CCT) y la CDP-colina:DAG fosfocolina transferasa, que sintetizan PC a partir de colina, ATP, CTP y DAG (Figura 4, E). Esta vía de síntesis de fosfolípidos compite por el DAG con la síntesis de TAG, de manera que la depleción de alguna de sus enzimas provoca una acumulación de TAG [33, 34].

El paso limitante de esta vía es la **CCT**, que se transloca a CLs en respuesta a ácido oleico [23, 24] desde su localización principal en el núcleo, y su actividad depende de la cantidad de fosfatidilcolina (PC) en los CLs [24]. Se ha propuesto un papel de la CCT durante la biogénesis de los CLs. En este proceso, los CLs van incrementando de tamaño, reduciéndose la ratio PC/TAG. Los autores de este trabajo sugieren que cuando esta ratio se reduce hasta un determinado nivel, la CCT se recluta en estos orgánulos, activándose e incrementando la síntesis de PC, con el objetivo de estabilizar el CL naciente. Aun así, la síntesis de PC *in situ* en los CLs por esta vía parece poco probable dado que la siguiente enzima de la vía es exclusiva de RE por lo que la PC debería llegar desde el RE a los CLs [22].

### **Ciclo de Lands**

El ciclo de Lands es la única vía que promueve la síntesis de fosfatidilcolina (PC) *in situ* en los CLs [25]. En este ciclo, la **PLA2** (fosfolipasa A2) genera liso-PC a partir de PC y las **LPCAT** (lisofosfatidilcolina-aciltransferasas) catalizan la unión de un acil-CoA a liso-PC obteniendo PC de nuevo (Figura 4, F) [22]. Las dos isoformas de LPCAT (LPCAT1 y LPCAT2) se localizan en el RE y en los CLs en respuesta a ácido oleico [25].

Dado que no generaría una ganancia neta de PC en la superficie del CL, este mecanismo permitiría el recambio de los AGs que forman parte de la PC producida por las otras vías. Este recambio sería parcialmente responsable de la diferente composición de fosfolípidos entre la monocapa del CL y la membrana del RE, y permitiría la modulación del grado de saturación de los AGs de los fosfolípidos modificando las propiedades de la monocapa externa de los CLs [8, 22].

### **Metilación de PE**

Por último, la PC puede sintetizarse mediante la metilación de la fosfatidiletanolamina catalizada por la enzima **PEMT** (fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa) (Figura 4, G). Esta vía de síntesis de PC es importante mayoritariamente en hepatocitos (donde representa el 30% de producción de PC) y en adipocitos diferenciados, y requiere la captación de metionina de la dieta. La PEMT se localiza en MAM (*mitochondrial associated membranes*, regiones del RE en contacto con las mitocondrias) y preferentemente usa fosfolípidos sintetizados en la mitocondria

como sustrato [30, 35]. Se ha propuesto que PEMT se encuentra en CLs en hepatocitos [36], mientras que en adipocitos, donde podría participar en la biogénesis de CLs, parece localizarse en regiones del RE en contacto con CLs [30].

## 2.1.2 Núcleo de lípidos neutros

El núcleo de los CLs está formado por ésteres de lípidos, mayoritariamente **triglicéridos** (TAG) y **ésteres de colesterol** (CE). La ratio entre estas dos especies lipídicas varía según el tipo celular. Así, mientras que en la mayoría de células se encuentran las dos especies en cantidades abundantes, en adipocitos los CLs están formados mayoritariamente por TAG y en macrófagos o células esteroi-dogénicas contienen principalmente CE. También se ha descrito que el núcleo de CLs puede contener **monoalquil(en)il-diacilgliceroles**, unos lípidos neutros cuya síntesis depende de peroxisomas. En algunos tipos celulares especializados, los CLs pueden contener otras especies lipídicas como los ésteres de **ácido retinoico** en CLs de células de retina y células estrelladas del hígado [8, 14, 20, 37].

En el interior del CL, las diferentes especies lipídicas podrían estar separadas entre sí según su hidrofobicidad pudiendo dar lugar a determinadas estructuras concéntricas observadas mediante microscopía electrónica [19, 38]. En CLs de levadura se ha sugerido que los ésteres de esteroides (análogos a los CE de mamíferos) formarían una capa cortical alrededor de los TAG y por debajo de la capa de fosfolípidos [39], por lo que la lipólisis de CE debería estar coordinada con la de TAG para permitir esta última [3].

En algunos casos se han observado estructuras internas de tipo membranoso en el núcleo de CLs, que podrían derivar del RE o que podrían ser restos de fosfolípidos sobrantes después de un proceso de fusión. También se han detectado algunas proteínas como la ciclooxigenasa [40], caveolina-1 o proteínas de la familia PAT [41]. Aunque estas observaciones contradicen el paradigma de estructura de los CLs, cabe destacar que solo han sido realizadas en CLs de leucocitos y macrófagos, por lo que podrían representar alguna estructura específica de estos tipos celulares [3, 42, 43].

A continuación detallaremos las vías de síntesis de las especies lipídicas mayoritarias en los CLs.

### Síntesis de novo de triglicéridos

La síntesis *de novo* de triglicéridos consiste en la reacción seriada de las enzimas **GPAT** (acil-CoA:glicerol-3-fosfato aciltransferasas), **AGPAT/LPAAT** (acil-CoA:acil-glicerol-3-fosfato aciltransferasas), **lipina** y **DGAT** (diacilglicerol aciltransferasa), a partir de glicerol-3-fosfato y ácidos grasos (Figura 3 y 4C). En todas estas reacciones, los AGs deben ser activados a acil-CoA por acil-CoA sintetetasas, explicadas más adelante.

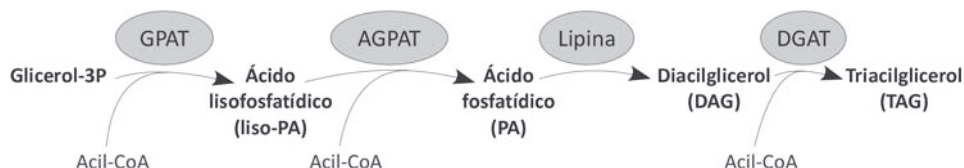


Figura 3. Vía de síntesis *de novo* de TAG.

El primer paso, y paso limitante de la síntesis de glicerolípidos (fosfolípidos y TAG), consiste en la síntesis del **ácido lisofosfatídico** (liso-PA) por las **GPAT** que unen un acil-CoA al glicerol-3-fosfato. Hay 4 isoformas de GPAT, dos ubicadas en la membrana externa mitocondrial (GPAT1 y 2) y dos en el RE (GPAT3 y 4), aunque recientemente se ha descrito el reclutamiento de GPAT4 en CLs en respuesta a ácido oleico, donde estaría implicada en la síntesis de TAG. Aunque la expresión de GPAT2, GPAT3 y GPAT4 modula la cantidad de TAG, GPAT1 parece la isoforma más relevante en la síntesis de este lípido. La competición por el acil-CoA entre GPAT1 y la carnitina palmitoil-transferasa-1 (CPT1) en la membrana externa mitocondrial determinaría el direccionamiento de los AGs para la esterificación o para la  $\beta$ -oxidación mitocondrial [44-47].

Seguidamente, las AGPAT/LPAAT conjugan el ácido lisofosfatídico a otro grupo acil produciendo **ácido fosfatídico** (PA). Existen diferentes isoformas de **AGPAT**; a pesar de que la expresión de AGPAT-1 afecta la cantidad de TAG en adipocitos, AGPAT-2 parece ser la isoforma más relevante en este modelo, puesto que su mutación provoca una severa lipodistrofia [45, 47]. La única isoforma detectada en CLs es la AGPAT-3, y se postula que este reclutamiento promueve la síntesis de TAG *in situ* en los CLs y conecuentemente el incremento de tamaño de los CLs [46]. Además, el PA también sirve como precursor de la síntesis de diferentes especies de fosfolípidos.

Una vez producido por las AGPAT/LPAAT, las **lipinas** defosforilan este fosfolípido produciendo **diacilglicerol** (DAG). Existen dos isoformas, lipina-1 y lipina-2,

de las que la más relacionada con la producción de TAG es la lipina-1, mientras que la lipina-2 estaría implicada en la síntesis de DAG en membrana para la transducción de señal [45]. La lipina-1 es una enzima citosólica que se localiza en el RE en respuesta a AGs, posiblemente mediante la unión a la seipina (proteína implicada en la interacción entre CLs y RE) [48]. Además, recientemente se ha descrito también en CLs [46, 49, 50]. Su deficiencia provoca una severa lipodistrofia, y su sobreexpresión en ratones obesidad [1, 51].

Los DAG están implicados en procesos de señalización, activando por ejemplo la quinasa PKC. El equilibrio entre el DAG y otras especies lipídicas, también implicadas en señalización, regula diferentes respuestas celulares implicadas en la lipotoxicidad de los AGs. Por ello, los niveles de DAG están finamente regulados por las **DGK** (quinasas de DAG) que fosforilan DAG produciendo PA, en lo que supone la reacción inversa a la realizada por las lipinas [52] (Figura 4).

El DAG también puede producirse a partir de monoacilglicéridos (MAG) mediante la reacción de las **MGAT** (MAG aciltransferasas), especialmente importante en células intestinales para la síntesis de quilomicrones a partir de los lípidos captados de la dieta [37, 45]. Las MGAT, como la MGAT2 o la DGAT1, se localizan en el RE [53, 54].

Finalmente, las enzimas DGAT catalizan la síntesis de **triglicéridos** (TAG) a partir de DAG. En mamíferos hay básicamente dos isoformas de **DGAT**, mientras que DGAT1 se encuentra en el RE, la localización de DGAT2 es controvertida. Se ha descrito en MAM y CLs, aunque no se puede descartar que se localice en el RE próximo a los CLs, dado que no se ha detectado en los diferentes análisis de proteómica de CLs [46, 53, 55, 56]. La sobreexpresión de DGAT2 provoca la formación de grandes CLs, de forma independiente de su anclaje en el RE [56]. Además, se ha propuesto que la DGAT2 localizada en los CLs sería más activa que aquella localizada en el RE [55]. Cada isoforma de DGAT estaría especializada en AGs procedentes de distintos orígenes. DGAT1 sería más relevante para la incorporación de AGs externos y para la re-esterificación de DAG procedente de la lipólisis, mientras que DGAT2 sería más activa para DAG sintetizados *de novo* a partir de glicerol-3-fosfato [54, 57]. DGAT1 también estaría implicada en la síntesis de TAG en el intestino para su secreción en quilomicrones [58, 59].

En adipocitos, la depleción combinada de DGAT1 y DGAT2 inhibe completamente la formación de TAG y la posterior acumulación de CLs, formándose unas estructuras membranosas posiblemente derivadas de un direccionamiento



de los AGs hacia la síntesis de fosfolípidos. Por lo contrario, en macrófagos dicha depleción no es capaz de inhibir la acumulación de CLs formados por CE ni la formación de TAG, indicando una posible formación de TAG mediante otras vías como la transacilación [60], en que dos moléculas de DAG reaccionan dando una molécula de MAG y otra de TAG. A pesar de que se ha detectado actividad DAG-transacetilasa en el RE de intestino de ratas [61], esta reacción parece más relevante en plantas.

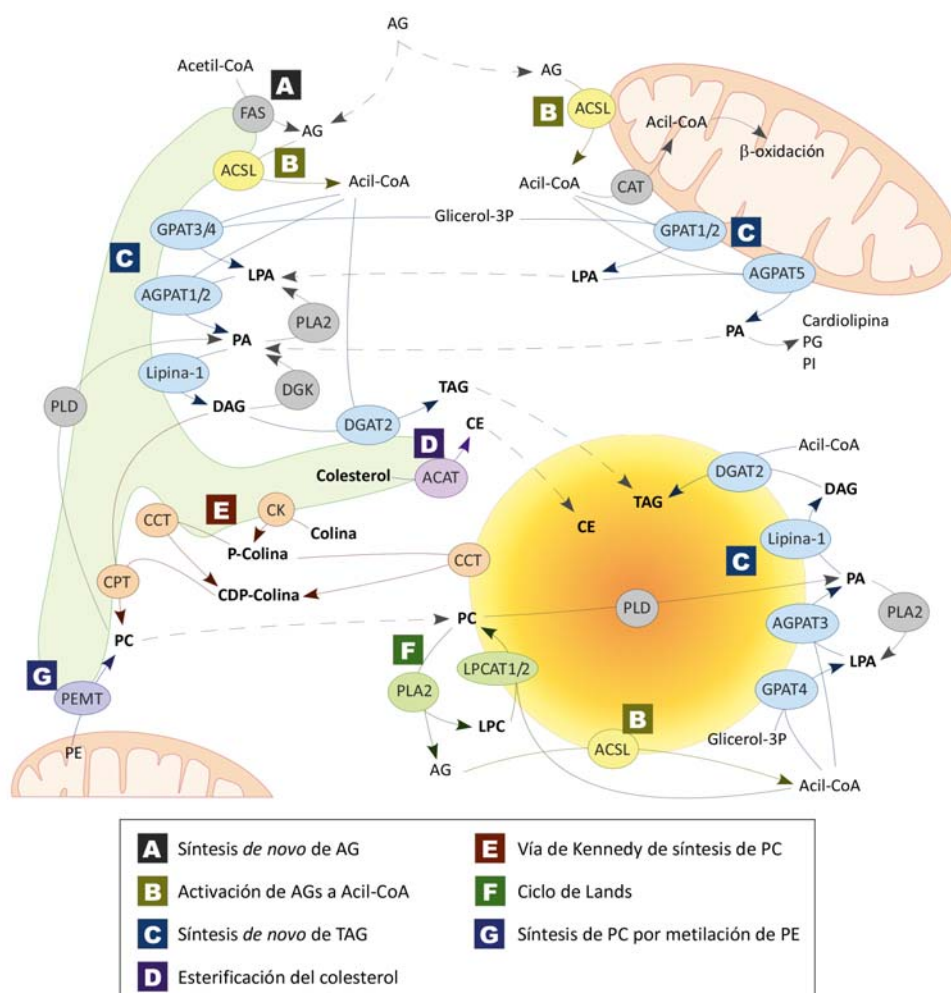


Figura 4. Vías de síntesis de glicerolípidos y localización de éstas.

### ***Síntesis de ésteres de colesterol***

En mamíferos, la síntesis de **ésteres de colesterol** (CE) se lleva a cabo por dos **ACAT** (acil-CoA:colesterol aciltransferasas) llamadas ACAT1 y ACAT2 [37]. Ambas isoformas son proteínas integrales de membrana localizadas en el RE. ACAT1 parece ser la isoforma más abundante, por lo que se ha propuesto que ACAT1 podría ser la isoforma constitutiva y ACAT2 la isoforma inducible. Mientras que ambas isoformas parecen participar en la síntesis de CE presente en las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) secretadas por el hígado, ACAT2 sintetizaría la mayoría de CE de los quilomicrones, estando implicada en la absorción intestinal de colesterol [37, 62]. Del mismo modo que los TAG, los CE también pueden incorporarse en CLs ya formados o promover la formación de éstos. En el caso de su incorporación a CLs maduros no está claro cómo se transportan desde su lugar de síntesis en el RE hacia los CLs, pudiendo ser mediante contactos que impliquen hemifusión de membranas o mediante proteínas transportadoras [63] (Figura 4, D).

### ***Esterificación de ácido retinoico***

La esterificación del **ácido retinoico** en el hígado es llevada a cabo mayoritariamente por la **LRAT** (lecitina:retinol aciltransferasa), usando la PC como donador de AGs. Por otro lado, la DGAT1 esterifica ácido retinoico libre con un AG obtenido a partir de acil-CoA y parece ser relevante en la piel, glándula mamaria y epitelio de retina [64].

## **2.2 Proteínas residentes en CLs**

Como se ha comentado anteriormente, en la monocapa de fosfolípidos se encuentran ancladas proteínas, que serán las encargadas de regular las diferentes funciones de los CLs, y que, como éstas, varían según el tipo celular o tejido. Debido a la relativa facilidad con la que se pueden aislar los CLs gracias a su flotabilidad, se han realizado múltiples estudios de proteómica de estos orgánulos en diferentes tipos celulares y tejidos. En estos estudios se han identificado centenares de proteínas. No obstante, muchas de ellas ejercen funciones conocidas en otros orgánulos y probablemente reflejen su interacción con los CLs.

## 2.2.1 Proteoma de los CLs

Se ha estudiado el proteoma de los CLs en adipocitos, enterocitos, hepatocitos, células pancreáticas, músculo esquelético y fibroblastos [65-74]. En estos estudios se han detectado alrededor de 300 proteínas diferentes, además el proteoma de los CLs parece ser muy dinámico y diferente según el tipo celular o la condición. Aun así, hay algunos grupos de proteínas encontrados con elevada frecuencia en estos análisis, dando una idea de las funciones comunes de los CLs en los diferentes tejidos.

Destaca la presencia de la **familia PAT** de proteínas residentes en los CLs formada por las proteínas: Plin1/Perilipina, Plin2/ADRP, Plin3/TIP47; Plin4/S3-12 y Plin5/OXPAT. De todas ellas, Plin2/ADRP es la proteína más representada en todos los tipos celulares, por lo que es usada comúnmente como marcador de CLs.

Asimismo, se han detectado en CLs hasta 24 proteínas diferentes de la **familia Rab**, implicada en la interacción entre orgánulos y el tráfico de membranas, entre las que Rab5, Rab7 y Rab18 son las proteínas más representadas, pudiendo indicar la interacción de los CLs con los endosomas o RE [75]. También se han encontrado proteínas de la familia **Arf** y **COP**, implicadas en el transporte de membranas, además de proteínas relacionadas con todos los tipos de **citoesqueleto**, tubulina, actina y vimentina. En todos los proteomas de CLs también se detectan diferentes proteínas en principio pertenecientes a otros compartimentos como RE, mitocondrias o lisosomas, y que normalmente se han considerado posibles contaminantes debidos a la interacción de los CLs con éstos. La presencia de este conjunto de proteínas en los CLs revela que son muy dinámicos y con una gran capacidad de interacción con otros orgánulos posiblemente para el trasvase de lípidos entre ellos.

Otro grupo muy importante de proteínas son aquellas implicadas en el metabolismo lipídico. Entre éstas, las más frecuentemente detectadas en los CLs son las **acil-CoA sintetasas**, encargadas de activar los AGs a acil-CoA, siendo ACSL3 la más representada. También se encuentran proteínas implicadas en la **lipólisis** como ATGL, HSL, MGL, CGI-58 y CGI-49. En los CLs también se detecta una gran cantidad de proteínas implicadas en la vía de **síntesis del colesterol** como la lanosterol sintetasa o la esqualeno epoxidasa y proteínas implicadas en la **síntesis de hormonas esteroideas** como proteínas de la familia de la 17- $\beta$ -hidroxiesterol deshidrogenasa y las citocromo b5 reductasas.

También se han detectado una gran cantidad de **chaperonas** como BIP/GRP78, calnexina, GRP94 y diferentes *heat-shock proteins* en los diferentes estudios, hecho que podría indicar o bien una gran proximidad del RE a los CLs, o bien también un papel específico de éstos como reservorio de proteínas antes de ser degradadas por el proteasoma y como almacén de proteínas para un uso posterior [76].

Finalmente proteínas implicadas en la **homeostasis de lípidos** como la caveolina-1, cavina-1/PTRF y las anexinas A2 y A6 también se han encontrado frecuentemente en CLs.

Así, del proteoma de los CLs se desprende que son orgánulos muy dinámicos, con un posible papel en el metabolismo lipídico, síntesis de hormonas esteroideas, almacén de proteínas mal plegadas y transporte de lípidos. Los CLs también podrían tener un papel en la señalización celular, puesto que proteínas relacionadas con este proceso se suelen encontrar en estos estudios, aunque ninguna de éstas en particular aparece representada de forma mayoritaria en los diferentes estudios.

## 2.2.2 Proteínas abundantes en los CLs

En este apartado se profundizará en las funciones de aquellos grupos de proteínas más estudiados y relevantes para este trabajo: la familia de proteínas PAT, las caveolinas y las acil-CoA sintetasas. Muchas de las otras proteínas mencionadas en el apartado anterior serán explicadas en otros apartados de esta tesis.

### ***Familia de proteínas PAT***

Las proteínas PAT son proteínas residentes en los CLs que comparten un dominio N-terminal llamado dominio PAT, de función poco conocida, por el que algunas de ellas interaccionan con la lipasa HSL [77]. Su nombre deriva de las proteínas que inicialmente formaron parte de esta familia: Perilipina, Adipofilina y TIP47. Posteriormente se les unieron S3-12 y OXPAT/MLDP/LSDP5.

Las proteínas PAT se han renombrado recientemente perilipina1 o Plin1 (perilipina), perilipina2 o Plin2 (adipofilina/ADRP/ADFP), perilipina3 o Plin3 (TIP47), perilipina4 o Plin4 (S3-12) y perilipina5 o Plin5 (OXPAT/MLDP/LSDP5) [78].

Plin1/perilipina se expresa en tejidos con gran acumulación de CLs, como el tejido adiposo blanco, el tejido adiposo marrón y células esteroideogénicas como la corteza adrenal y células de Leydig [14, 79]. Más recientemente se ha descrito su expresión en hígados con esteatosis, en macrófagos, en mastocitos y en algunas clases de tumores con gran cantidad de CLs [80-83]. Con respecto al resto de proteínas de la familia, Plin2 y Plin3 se expresan de forma ubicua mientras que Plin4 se restringe a adipocitos y Plin5 a tejidos oxidativos como el músculo esquelético, tejido adiposo marrón e hígado [3].

**Plin1/perilipina** se localiza mayoritariamente en los CLs a donde llegaría a partir del RE. En ausencia de lípidos Plin1/perilipina se degradaría vía proteasoma [84, 85]. La función de esta proteína consiste en la regulación de la lipólisis en respuesta a hormonas, inhibiendo la lipólisis basal y activándola al ser fosforilada por PKA (explicado más adelante). Los ratones deficientes en Plin1 tienen un tejido adiposo muy reducido, son resistentes a la obesidad inducida por la dieta y acaban desarrollando resistencia a la insulina. Además, posiblemente por su función en macrófagos, estos ratones son más propensos a la aterosclerosis [79, 86].

**Plin2/ADRP** es una proteína residente en los CLs que une a ácidos grasos, fosfolípidos y colesterol, y se incorpora a éstos desde el citosol [87]. La cantidad de Plin2 refleja la cantidad de CLs en células no-adipocitarias, dado que se expresa en respuesta a AGs [88] y se degrada por el proteasoma al disminuir los niveles de TAG [89, 90]. A su vez, la expresión de Plin2 regula la acumulación de TAG. La sobreexpresión o la disminución de Plin2 incrementa o reduce respectivamente la acumulación de CLs [79, 91-94]. Plin2 desplaza la lipasa ATGL de los CLs [91] por lo que promueve la acumulación de TAG reduciendo la producción de lipoproteínas y la  $\beta$ -oxidación de AGs [92]. Así, Plin2 es especialmente importante en el hígado, donde su supresión protege de la esteatosis tanto inducida por la dieta [79] como por la hepatectomía parcial [95], traduciéndose en una regeneración hepática defectuosa.

**Plin3/TIP47** es una proteína estable en el citosol y se recluta en los CLs tanto en condiciones de biogénesis como lipolíticas, en respuesta a un incremento de DAG en éstos [96, 97]. La depleción de Plin3 reduce la incorporación de TAG a los CLs alterando su maduración, hecho que se traduce en un mayor número de CLs de menor tamaño [98, 99]. Además, su supresión en el hígado de ratones reduce la esteatosis hepática inducida por una dieta rica en grasas [100].

Con respecto a **Plin4/S3-12** y **Plin5/OXPAT**, Plin4 facilitaría el almacén de lípidos neutros en adipocitos, mientras que Plin5 promovería la acumulación de lípidos para su posterior uso en tejidos oxidativos. Plin4 y Plin5 se comportan de forma similar a Plin3, siendo estables en el citosol e incorporándose a los CLs pequeños durante la biogénesis o la lipólisis, en respuesta a DAG [79, 97, 101].

En los CLs, las proteínas de la familia PAT se desplazan unas a otras, lo que les permite compensar parcialmente su función en caso de eliminación de una de ellas. Plin2 y Plin3 se pueden substituir entre sí cuando la otra falta, además la expresión de Plin2 desplaza Plin3 de los CLs [79, 91, 99, 102]. Plin2 sustituye a Plin1 en los CLs de adipocitos en ratones deficientes en esta última, aunque inhibe de forma menos eficiente la lipólisis basal y no facilita la lipólisis estimulada por  $\beta$ -adrenérgicos [79]. Además, durante la diferenciación de los adipocitos aumenta la expresión de Plin1 que desplaza a Plin2 de los grandes CLs [79].

Dentro de una misma célula los CLs son heterogéneos, existiendo poblaciones con composiciones lipídicas y proteicas diferentes. Se ha descrito que las diferentes proteínas PAT podrían regular dicha heterogeneidad intracelular puesto que tienen afinidad por CLs de diferente composición y que la sobreexpresión de cada Plin, en células cultivadas con ácido oleico y colesterol, promueve la acumulación de la clase de CL con que interacciona (formado por TAG o CE) en detrimento de la otra [103]. La isoforma A de Plin-1 se localiza mayoritariamente en CLs formados por TAG; Plin2 y Plin3 pueden encontrarse en CLs formados por TAG y por CE, a pesar de que Plin2 muestra una preferencia por los formados por TAG. Plin4 y Plin5 tienen preferencias opuestas, prefiriendo Plin5 aquellos CLs formados por TAG y Plin4 los formados por CE. La presencia de aquellos CLs por los que es afín modula la estabilidad de cada proteína[103].

El reclutamiento de proteínas PAT a los CLs evoluciona según la maduración de los CLs en adipocitos. En estado basal los grandes CLs del adipocito se marcan casi exclusivamente por Plin1, pero al añadir ácido oleico, a los pocos minutos se observa la formación de pequeños CLs periféricos marcados por Plin2, 3 y 4. Durante las siguientes horas de maduración, la localización de Plin3 y 4 se restringe a los CLs de menor tamaño y más periféricos mientras Plin2 se localiza en los CLs de tamaño mediano situados en una zona intermedia. Finalmente al cabo de unas horas Plin1 se va reclutando en los CLs que han ido madurando y aumentando de tamaño, indicando que los CLs nacientes finalmente acaban reclutando Plin1 al llegar a cierto estado de maduración. Al finalizar la adición de AGs en el medio, los adipocitos acaban volviendo al estado basal con grandes

CLs solamente marcados por Plin1 [104]. Otro ejemplo de reclutamiento diferencial se da en el intestino, donde Plin3 se une a los CLs formados después de una ingesta aguda de lípidos mientras que Plin2 se encuentra en los CLs en intestinos sometidos a una ingesta crónica de lípidos [105].

### **Caveolinas / Cavininas**

Las caveolinas son proteínas mayoritariamente situadas en la cara interna de la membrana plasmática, donde mediante su oligomerización y unión a determinados lípidos y proteínas, forman las caveolas. Estas estructuras son invaginaciones de la membrana plasmática con forma de bulbo, ricas en colesterol, que están implicados en múltiples procesos como la transducción de señal, la detección de las fuerzas mecánicas, la endocitosis, la transcitosis, la adhesión y la migración celular y el transporte de lípidos [106-108].

La familia de las caveolinas en mamíferos está formada por caveolina-1, caveolina-2 y caveolina-3. Caveolina-1 se expresa en la mayoría de tejidos, especialmente en endotelio y tejido adiposo, excepto en el músculo, mientras que caveolina-3 es específica de este tejido [107, 109]. Aunque se ha descrito la presencia de caveolina en múltiples localizaciones intracelulares [110], las tres isoformas se localizan de forma mayoritaria en la membrana plasmática, aunque caveolina-2 requiere de la oligomerización con alguna de las otras dos para llegar a este compartimento [106]. La expresión de caveolina-1 o 3 es necesaria para la formación de caveolas [109].

Como hemos comentado, las caveolinas están relacionadas con multitud de procesos, a continuación detallaremos tan sólo aquellos procesos de mayor relevancia para este trabajo: el transporte de colesterol y CLs.

#### Caveolinas, tráfico intracelular y transporte de colesterol

Caveolina-1 une AGs mediante sus cargas positivas del extremo C-terminal [109, 111] y, mediante su dominio *scaffolding* une colesterol [107, 112, 113]. La caveolina sintetizada *de novo* en el RE forma oligómeros en este orgánulo de forma dependiente de colesterol e inmediatamente es transportada hacia el aparato de Golgi donde se acumula. En este orgánulo la caveolina sufre un nuevo proceso de oligomerización, generando complejos de elevado peso molecular que incorporan gran cantidad de colesterol. Estos complejos son transportados a la membrana plasmática donde darán lugar a la formación de caveolas [110].

La velocidad de esta ruta de transporte depende de la disponibilidad de colesterol [114]; además, el colesterol también regula la expresión de caveolina a nivel transcripcional.

La caveolina puede desplazarse desde la membrana plasmática o desde el RE a diferentes localizaciones intracelulares. Su alta afinidad por el colesterol, además de la capacidad de la caveolina de translocarse rápidamente entre diferentes orgánulos, ha llevado a postular un papel de esta proteína como transportador intracelular de colesterol [110].

El tratamiento con AGs [73, 106, 114-117] o colesterol [113] provoca el reclutamiento tanto de caveolina-1 como de caveolina-2 a los CLs. El transporte hacia los CLs se puede llevar a cabo desde el RE o desde la membrana plasmática. La localización de la caveolina-1 en los CLs es muy dinámica, volviendo a la membrana plasmática al eliminar el exceso de AGs del medio [115]. Dado que la caveolina-1 está implicada en el transporte de colesterol sintetizado *de novo* a la membrana plasmática [110] y que los CLs de adipocitos deficientes en caveolina-1 tienen menos colesterol [113], la translocación de caveolina-1 entre la membrana plasmática y los CLs podría ser un reflejo de su implicación en el transporte de AGs y colesterol hacia estos orgánulos [118].

Las caveolinas también se reclutan en los CLs durante la regeneración hepática, la diferenciación y la estimulación de la lipólisis en adipocitos [66, 115, 119, 120]. Además, la inhibición de la salida de proteínas del RE mediante brefeldina A o formas truncadas de caveolina que evitan su salida del RE, localizan a estas proteínas en los CLs, demostrando el transporte directo entre RE y CLs [114, 121, 122]. Esta vía de localización en los CLs como consecuencia de la acumulación excesiva en el RE podría ser común para diferentes proteínas de membrana plasmática, puesto que también se ha observado en el caso de estomatina, que normalmente se ubica en *lipid rafts* en la membrana o en endosomas [72].

#### Caveolina y regulación de los CLs

Los niveles de caveolina-1 correlacionan con la capacidad de acumular CLs. En células de origen hepático, se ha demostrado que la sobreexpresión de caveolina-1 incrementa la acumulación de CLs [123], mientras que su deficiencia la reduce [124, 125]. Los ratones deficientes en caveolina-1 son incapaces de regenerar el hígado debido a su incapacidad de acumular CLs después de hepatectomía parcial [124], hecho esencial para la correcta proliferación de hepatocitos



durante este proceso [126]. El efecto de la caveolina-1 sobre la acumulación de CLs podría deberse a que es necesaria para la localización del transportador de AGs CD36 en la membrana plasmática [127].

Se ha propuesto que en adipocitos, las caveolas tendrían la capacidad de sintetizar TAG que se incorporaría posteriormente a los CLs [128]. Los adipocitos deficientes en caveolina-1 tienen CLs de menor tamaño y con una composición de fosfolípidos alterada [129]. Los ratones deficientes en caveolina-1 desarrollan lipodistrofia acompañada de hiperlipidemia y resistencia a la obesidad inducida por una dieta rica en grasas [118]. Aun así, la deficiencia de caveolina-1 no impide la diferenciación de adipocitos *in vitro*, aunque provoca una menor acumulación de lípidos y una mayor autofagia en éstos [130], hecho que ha llevado a sugerir que el fenotipo lipodistrófico de los ratones deficientes en caveolina-1 se debería a la incapacidad del tejido adiposo de almacenar una gran cantidad de lípidos, manteniendo éstos en circulación [118].

La sobreexpresión de caveolina-1 protege de la lipotoxicidad. Se ha propuesto que, debido a su unión a AGs, la caveolina tendría un efecto tampón frente a la presencia de éstos en las membranas, estabilizándolos en la cara citoplasmática de la membrana celular [123]. En consonancia con un efecto protector sobre los AGs, la falta de caveolina-1 provoca muerte celular y fibrosis en el tejido adiposo [131].

Caveolina-1 podría tener un papel activador de la lipólisis. Se ha descrito que interacciona con PKA y con Plin1 [132, 133]. Además, su deficiencia disminuye la activación de la lipólisis en respuesta a  $\beta$ -adrenérgicos, como consecuencia de la reducción de la señalización de PKA en el tejido adiposo [131, 133, 134]. Estos trabajos proponen un posible papel de caveolina-1 como *scaffold* de PKA en los CLs. No obstante, la ausencia de caveolina-1 en adipocitos diferenciados en cultivo no provoca un defecto en la activación de PKA ni la disminución de la lipólisis en respuesta a hormonas, de hecho se observa un incremento de ésta, por lo que los efectos anteriores podrían ser indirectos [120]. En consonancia con un papel de caveolina en la lipólisis, la expresión de la forma truncada de caveolina Cav3DGV, que actuaría como dominante negativo, reduce su metabolización además de inhibir la dinámica de los CLs [115].

### Cavinas y CLs

Las cavinas, junto a las caveolinas, son un componente estructural y esencial para la formación de caveolas y regulan los niveles de caveolina [109, 135, 136]. Los ratones deficientes en cavina-1 tienen un fenotipo de lipodistrofia similar a los deficientes en caveolina-1 [109]. Cavina-1 se asocia a los CLs en adipocitos formando un complejo con caveolina-1 [129] y es fosforilada por PKA y promueve la lipólisis inducida por  $\beta$ -adrenérgicos [137]. Además, la deficiencia de cavina-1 reduce la captación de AGs [136].

### **Acil-CoA sintetasas**

Las acil-CoA sintetasas (ACS) catalizan la activación de los AGs mediante su esterificación con coenzima A formando acil-CoA, en una reacción que consume una molécula de ATP y genera una de AMP. El acil-CoA será sustrato de las principales reacciones tanto anabólicas como catabólicas que usan AGs, como la  $\beta$ -oxidación o la síntesis de TAG, CE y fosfolípidos, y también de la modificación post-traducciona de algunas proteínas [138].

La actividad ACS protege a las células de la lipotoxicidad permitiendo el metabolismo de los AGs, y su inhibición provoca un incremento en la cantidad de AGs libres con la consecuente lipotoxicidad y activación de la apoptosis [139]. Se ha propuesto que la activación de AGs a acil-CoA promueve la captación de AGs quedando retenidos en el citoplasma, mecanismo que ha sido denominado trampa metabólica (*metabolic trap*) [141]. Aun así, el efecto de cada una de las diferentes proteínas ACS sobre la captación de AGs es controvertido y en muchos casos podría ser indirecto.

Nombre	Miembros	Sustrato preferente
<b>ACSS</b>	ACSS1, ACSS2 y ACSS3	AGs de cadena corta
<b>ACSM</b>	ACSM1, ACSM2A, ACSM2B, ACSM3, ACSM4 y ACSM5	AGs de cadena media
<b>ACSL</b>	ACSL1, ACSL3, ACSL4, ACSL5 y ACSL6	AGs de cadena larga (12-22C)
<b>ACSVL/FATP</b>	ACSVL1/FATP2, ACSVL2/FATP6, ACSVL3/FATP3, ACSVL4/FATP1, ACSVL5/FATP4 y ACSVL6/FATP5	AGs de cadena larga (12-22C) AGs de cadena muy larga (>22 C)
<b>ACS de la familia <i>Bubblegum</i></b>	ACSBG1 y ACSBG2	AGs de cadena muy larga (>22 C)
<b>Otras ACS</b>	ACSF1, ACSF2, ACSF3 y ACSF4	

**Tabla 1. Proteínas con actividad ACS.**

Existen 26 proteínas humanas con actividad acil-CoA sintetasa, clasificadas según la longitud de la cadena de los AGs que utilizan como sustrato principal [140] (Tabla 1 de la Introducción). Dado que las ACSL son las ACS más frecuentemente detectadas en los CLs, nos centraremos en ésta subfamilia.

Las **ACSL** activan los AGs de cadena larga (entre 12 y 22 átomos de carbono), que representan las formas mayoritarias encontradas en la dieta. Las variaciones en la profundidad y anchura del dominio de unión a AGs, llamado dominio *Gate*, e identificado por homología con la ACS bacteriana, determinan la especificidad de sustrato [150]. La especificidad de sustrato es diferente según la isoforma [142-147], hecho que determina su función. Por ejemplo, la especificidad de ACSL4 para el ácido araquidónico producido por la PLA2, la hace importante para re-sintetizar fosfolípidos [148], la síntesis de prostaglandina E2 [146] o el direccionamiento de ácido araquidónico a la mitocondria para la producción de hormonas [149]. Se ha propuesto que la especificidad de sustrato de algunas ACSLs también se extendería al origen de los AGs [151], así, unas isoformas serían más activas para los AGs derivados de la lipólisis de los CLs, mientras que otras actuarían preferentemente sobre aquéllos AGs captados del exterior o sintetizados *de novo* [152-156]. Además, la afinidad por el ATP también es diferente según la isoforma [142].

Mientras que ACSL1, 3 y 5 son proteínas de membrana, ACSL4 se asocia a membranas probablemente por interacción con otras proteínas [157]. La unión a membrana también afectaría a la actividad ACSL, dado que la presencia del dominio N-terminal, que ancla ACSL3 a las membranas, es necesaria para su actividad [158].

Las diferentes isoformas tienen diversas localizaciones intracelulares, que además, para algunas de ellas, cambian según el tejido, pudiendo corresponder a formas de *splicing* alternativas. Por ejemplo, **ACSL1** tiene diferentes formas de *splicing*, algunas más relacionadas con la lipogénesis y otras con la  $\beta$ -oxidación, curiosamente se ha detectado en el RE (donde se lleva a cabo la lipogénesis), en la membrana externa mitocondrial (desde donde participa en la  $\beta$ -oxidación), en las MAM, en membrana plasmática y en citosol [138, 152, 159-166]. Además, mediante proteómica se ha detectado en CLs en diferentes tejidos [46, 65-67, 71, 74].

Las proteínas de la familia ACSL se han relacionado con la acumulación de CLs, aunque la responsabilidad de cada isoforma en este proceso está poco es-

tablecida y podría depender del modelo. La triacina C (TRC) es el inhibidor de ACSLs más frecuentemente usado e inicialmente se describió como específico para ACSL1, ACSL3 y ACSL4 [142], aunque recientemente se ha descrito la sensibilidad de la ACSL5 humana a TRC [169]. Mientras que no inhibe la incorporación de AGs exógenos a fosfolípidos, el tratamiento con TRC impide la incorporación de AGs, tanto exógenos como procedentes de la lipólisis, a TAG y la consecuente acumulación de CLs [168, 170-172].

La ACSL más relacionada con los CLs parece ser la **ACSL3**. Esta proteína se localiza en el RE [167] y se recluta en CLs al tratar las células con ácido oleico [46, 158, 168], donde interaccionaría con GPAT4, implicada en la síntesis de glicero-lípidos [46]. ACSL3 es la ACS más veces detectada mediante proteómica en los CLs, además de ser la segunda proteína más expresada en CLs de células Huh7 [69]. A pesar de ello, ACSL4, ACSL5 y ACSL6 también han sido detectadas en CLs en determinadas situaciones [66-69, 71, 73, 74].

La relación de **ACSL3** con la acumulación de TAG es controvertida. La expresión de ACSL3 correlacionaría con una menor acumulación en células HepG2 e hígado de hamster [181, 182]. Por otro lado, la expresión de ACSL3 incrementa durante el estrés de retículo en células de hepatoma y en hígado, situación en que se acumulan CLs [183]. ACSL3 también se ha implicado en la captación de AGs [158, 184], en el uso de AGs de origen exógeno para la  $\beta$ -oxidación [181] y la síntesis de fosfolípidos [156], y también en el recambio de AGs de los fosfolípidos [185].

El efecto de las otras isoformas como **ACSL1** en la acumulación de CLs depende del tipo celular, probablemente debido a su papel dual tanto en la lipogénesis como en la  $\beta$ -oxidación, el balance entre las cuales podría determinar la acumulación final de TAG [155, 173-177]. ACSL1 se ha implicado en la  $\beta$ -oxidación en hepatocitos, células musculares, tejido adiposo blanco y tejido adiposo marrón [155, 175, 178], esta proteína forma un complejo con CPT-1 (Carnitina palmitoil-transferasa-1, el transportador de AGs hacia el interior de la mitocondria) y VDAC (canal situado en la membrana externa mitocondrial), que permitiría el direccionamiento de los AGs activados por ACSL1 a la  $\beta$ -oxidación mitocondrial [179]. Además, la activación de los AGs procedentes de la lipólisis en adipocitos por parte de ACSL1 produce AMP activando AMPK (quinasa activada por AMP), que a su vez, activa CPT-1 [166, 180].

### 2.2.3 Direccionamiento de proteínas a los CLs

En los apartados anteriores se han comentado las diferentes proteínas residentes en CLs. Tal diversidad de proteínas reclutadas en CLs desde diferentes localizaciones implica la existencia de diferentes mecanismos de direccionamiento hacia los CLs.

Las proteínas residentes en los CLs pueden reclutarse directamente desde el **citósol** o llegar por **difusión lateral** a través de los puntos de contacto entre los CLs y otros orgánulos, especialmente desde el RE durante el proceso de biogénesis de los CLs. Además de por estas vías, se ha propuesto el reclutamiento de determinadas proteínas a los CLs mediante **transporte vesicular** (Figura 5).

Proteínas como Arf1, GBF1 y PLD, implicadas en el sistema de transporte vesicular Arf1/COPI que media el transporte desde el aparato de Golgi al RE, se localizan en los CLs donde se reclutarían en respuesta a Arf1-GTP, permitiendo la actividad de este sistema en la superficie de los CLs. Se ha propuesto que este mecanismo sería necesario para formación de CLs en respuesta a ácido oleico [23, 74, 186, 187], aunque el efecto de la perturbación de esta vía sobre la acumulación de CLs es controvertido [23, 188, 189]. La alteración de este sistema afecta al reclutamiento de proteínas que regulan los CLs como Plin2/ADRP [190] y Plin3/TIP47 [191]. Como consecuencia de ello, o mediante interacción directa [192], el sistema Arf1/COP-I regula el reclutamiento de la lipasa ATGL [189, 191] afectando a la lipólisis [188, 191].

Recientemente se ha descrito que el sistema Arf1/COP-I es capaz de escindir microCLs a partir de CLs artificiales *in vitro* reduciendo la ratio PL/TAG de los CLs iniciales hecho que expone en mayor medida los TAG del núcleo hidrofóbico haciendo al CL más proclive a interactuar con otras membranas celulares y facilita el reclutamiento de determinadas proteínas como  $\alpha$ -sinucleína (el reclutamiento de la cual depende del empaquetamiento de los fosfolípidos en las membranas) [193]. Hecho que podría explicar el efecto de este sistema en el reclutamiento de otras proteínas a los CLs.

Independientemente de la vía por la que accedan a los CLs, el reclutamiento de proteínas a estos orgánulos puede seguir diferentes estrategias moleculares: mediante hélices anfipáticas, dominios hidrófobos, modificaciones lipídicas o interacción con proteínas residentes en los CLs.

### ***Hélices anfipáticas***

Muchas proteínas, como por ejemplo ACSL3, requieren de hélices anfipáticas para su reclutamiento en CLs [24, 158, 187, 194, 195]. Las hélices anfipáticas se insertan en la monocapa de fosfolípidos que recubre los CLs. La composición lipídica de dicha monocapa regula la unión de las hélices anfipáticas a ésta. Por ejemplo, la región anfipática de CCT detecta membranas deficientes en fosfatidilcolina [24]. Plin2/ADRP también interacciona con fosfolípidos en la superficie de los CLs, teniendo alta afinidad por PC y en menor medida por esfingomielina [196]. Por otro lado, Plin3/TIP47 se recluta en CLs de forma dependiente de DAG [97].

Algunas proteínas, como por ejemplo las proteínas de la familia PAT [197, 198], o la proteína *core* del virus de la Hepatitis C (HCV) [199] combinan diferentes tipos de secuencias. Además de hélices anfipáticas en el extremo N-terminal, cada proteína de la familia PAT cuenta con otros dominios. Plin1/Perilipina tiene tres secuencias hidrofóbicas en la región C-terminal necesarias para su localización en CLs [197] y se movilizaría desde el RE [85]. Plin2/ADRP por su lado, carece de secuencias hidrofóbicas y contiene otra hélice anfipática en el extremo C-terminal [198]. Por otro lado, Plin3/TIP47 combina la secuencia anfipática con otra secuencia muy flexible, similar a la de la apolipoproteína E para las lipoproteínas, capaz de plegarse en si misma para permitir la estabilidad de la proteína también en solución acuosa en el citosol, donde se localiza en ausencia de CLs [97].

### ***Secuencias hidrofóbicas***

Las secuencias hidrofóbicas de direccionamiento a CLs son dominios formados por 30-40 aminoácidos que se embeben en la monocapa de fosfolípidos y la parte externa del núcleo hidrofóbico. Estos dominios normalmente contienen aminoácidos como las prolinas en la zona central de esta secuencia que permite el plegamiento de su estructura en forma de horquilla dejando los dos extremos de la proteína encarados hacia el citosol.

La estructura de los CLs excluye la posibilidad del reclutamiento de proteínas con dominios transmembrana puesto que implicarían la localización de las regiones hidrófilas que hacen de puente entre secuencias hidrófobas de la proteína en el interior hidrófobo de los CLs. El hecho que mediante proteómica se hayan detectado proteínas de este tipo en los CLs probablemente refleja la contaminación por contacto de los CLs con otros orgánulos [8, 15, 104, 200].

Entre las proteínas que contienen secuencias hidrofóbicas en forma de horquilla en la zona central de su secuencia destacan las caveolinas [121], 17-hidroxisteroid deshidrogenasas [201], las oleosinas de las plantas y la proteína *core* del HCV [202]. Otras proteínas como AUP-1, AAM-B, ALDI, UBXD8 o la citocromoB5 reductasa3 (CYTB5R3) poseen estas secuencias en el extremo N-terminal [203]. Aunque estructuralmente no sería necesario, estas últimas también mantienen la estructura en forma de horquilla mencionada anteriormente [203], indicando la posible necesidad de dicha conformación para el reclutamiento de proteínas con dominios hidrófobos a los CLs.

Analizando el transporte de caveolina y la proteína ALDI a CLs, nuestro grupo demostró que las proteínas con estas secuencias hidrofóbicas requieren adicionalmente una secuencia de aminoácidos de carga positiva [204] que podrían mediar la interacción con determinados fosfolípidos [205], para su localización en CLs. Secuencias similares se han encontrado en otras proteínas con dominios hidrofóbicos de reclutamiento a CLs [201, 204]. Posteriormente, también se ha demostrado la cooperación entre una secuencia hidrófoba y secuencias cargadas positivamente para direccionar a CLs tanto caveolina-2 [116], como la proteína de la cápside del virus del Dengue [206], AUP-1 y Rdh10 [207, 208].

Este tipo de secuencia señal permitiría a estas proteínas reclutarse a los CLs por difusión lateral a través de los lugares de contacto entre CL y RE desde la membrana del RE, donde se localizan estas proteínas en ausencia de ácidos grasos. Dicho transporte ha sido demostrado para proteínas como ALDI, caveolina, AAM-B y UBXD8 [43, 204, 209]. En estos casos, la secuencia hidrofóbica en forma de horquilla se encargaría del anclaje a la membrana del RE mientras que la secuencia positiva direccionaría a la proteína hasta los CLs interactuando con el RE (frecuentemente durante la biogénesis de CLs) [204].

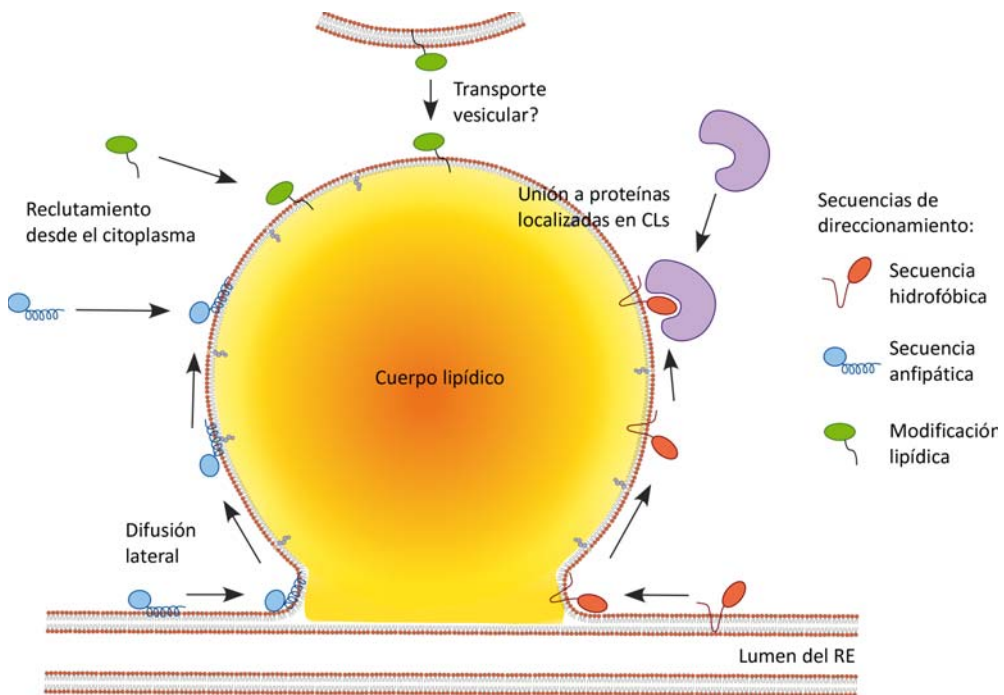
### ***Modificaciones lipídicas***

Aunque no se ha demostrado hasta el momento de forma experimental, se ha propuesto que la modificación lipídica de proteínas podría permitir el anclaje de proteínas en los CLs, como así lo hace en las diferentes membranas celulares. Proteínas de la familia Rab, como Rab5, Rab7 y Rab18, ampliamente detectadas en los CLs, pertenecerían a esta clase de proteínas [8]. Se desconoce el mecanismo por el cual se reclutan estas proteínas a los CLs, pudiendo llegar por difusión

lateral desde el RE o por transporte vesicular.

### ***Interacción con proteínas ancladas en los CLs***

Las proteínas sin estructuras hidrófobas pueden localizarse en los CLs por interacción con otras proteínas como sucede en el caso de la lipasa sensible a hormonas (HSL), cuyo reclutamiento a CLs depende de la unión a Plin1/Perilipina fosforilada por PKA en respuesta a hormonas [8].



**Figura 5. Vías de reclutamiento de proteínas a CLs. Adaptado de [8].**



## 2.2.4 Acumulación y degradación de proteínas en los CLs

El proteoma de los CLs contiene muchas proteínas con localización teórica en otros orgánulos y cuya presencia en CLs ha sido corroborada por otros métodos. Algunos ejemplos son las histonas y Prp19p (núcleo), IMPDH,  $\alpha$ -sinucleína y Hsp70 (citósol), estomatina (membrana), escualeno epoxidasa y apolipoproteína B (RE) o Nir2 (aparato de Golgi). En algunos casos estas proteínas participan en una función específica en los CLs, pero en otros casos, los CLs serían un refugio temporal para éstas, previo a su degradación [76].

Se ha propuesto que los CLs podrían ser un **almacén de proteínas mal plegadas** [210] que expongan dominios hidrófobos internos al exterior haciéndola proclive a formar agregados citosólicos potencialmente tóxicos. Su localización en los CLs permitiría evitar dicha toxicidad. En consonancia con esta hipótesis, la sobreexpresión de  $\alpha$ -sinucleína, que forma agregados en la enfermedad de Parkinson, promueve la acumulación de CLs [76]. Además, la retención de apolipoproteína B en los CLs evita la formación de agregados citosólicos [14]. Como se ha comentado anteriormente, mediante proteómica se han detectado frecuentemente chaperonas en los CLs. De esta manera, los CLs podrían tener un papel en el plegamiento de las proteínas. Por ejemplo, la chaperona Hsp70, localizada en CLs en respuesta a calor, podría encargarse de plegar proteínas mal plegadas acumuladas en CLs en esta situación [211].

La localización en los CLs también podría estabilizar proteínas que en el citósol serían degradadas rápidamente, como es el caso de las histonas durante el desarrollo de *Drosophila* [76]. Otra posible función de los CLs en relación a las proteínas acumuladas en éstos podría ser el transporte de proteínas entre diferentes localizaciones intracelulares mediante su interacción con los diferentes orgánulos, en una función análoga a la de las lipoproteínas que transportan proteínas entre diferentes tejidos [76].

Por otro lado, los CLs participarían en la **degradación de proteínas**. Se ha descrito que estos orgánulos contienen subunidades del complejo del proteasoma [23] y tienen la capacidad de poliubiquitinar proteínas *in vitro* [212]. En este sentido, recientemente se ha postulado que los lugares de contacto entre CL y RE podrían funcionar como plataforma de degradación de proteínas por el proteasoma y la proteína AUP1 participaría en este proceso reclutando una E2-ubiquitin ligasa [213, 214]. Se ha descrito la degradación de determinadas proteínas

localizadas en CLs vía proteasoma como por ejemplo CideC/Fsp27 [215], Plin1/Perilipina y Plin2/ADRP [89, 90], la estabilidad de las cuales viene determinada por la cantidad de TAG.

La actividad del proteasoma asociada a CLs puede regular la acumulación de estos orgánulos a través de la degradación específica de algunos de sus reguladores. Se ha descrito que la proteína espartina/SPG20, que recluta la E3 ubiquitin ligasa AIP4 a CLs, modula el tamaño y número de éstos mediante la degradación de Plin2/ADRP [216, 217]. Plin3/TIP47 participaría en este proceso reclutando a espartina/SPG20 en los CLs y promoviendo la degradación de Plin2/ADRP [216, 218, 219]. Los CLs también tendrían un papel en la regulación de la secreción de VLDL en el hígado a través de la degradación de apolipoproteína B. Esta proteína se encuentra poliubiquitinizada en los CLs y la inhibición del proteasoma incrementa su acumulación en éstos [220].

## 2.3 ARN en los CLs

En células del sistema inmune, mediante microscopía electrónica, se ha relacionado a los CLs con el ARN. En estas células frecuentemente se han observado ribosomas en contacto con los CLs. Además se ha detectado la incorporación de uridina, componente del ARN, al interior de los CLs, y la presencia de ARN mensajero mediante la detección de su cola de poli-adenina [221]. Cabe destacar que en los leucocitos se han observado estructuras membranosas procedentes del RE en el núcleo hidrófobo de los CLs [222]. También se han detectado en CLs de mastocitos ARN nucleares pequeños con función en la regulación del *splicing* [221]. Además, proteínas implicadas con el *splicing* como Prp19p se localizan en CLs [223].

Se desconoce si la localización de ARN en CLs de leucocitos se puede extender a otros tipos celulares y la especificidad de los ARN localizados en estos. Algunos ARN se transportan hacia distintas localizaciones subcelulares donde serán traducidos a proteína. Así, la localización de ARN en los CLs podría estar relacionada con la síntesis de proteínas en los CLs o en el transporte de estos ARN hacia otras partes de la célula [76]. De forma análoga, se ha demostrado que las lipoproteínas, con estructura muy similar a los CLs, transportan microRNAs entre diferentes tejidos [224].



# FORMACIÓN DE LOS CUERPOS LIPÍDICOS

La formación de los CLs consta de dos pasos, la biogénesis inicial y la posterior maduración hasta llegar a su volumen final.

## 3.1 Modelos de biogénesis de CLs

Al contrario de otros orgánulos como las mitocondrias, los CLs no se autoreplican y se sintetizan *de novo*. En bacterias los CLs se generan en la membrana plasmática, mientras que en eucariotas, mayoritariamente derivan del RE, donde se localizan la mayoría de enzimas de síntesis de los lípidos que los forman. No obstante, en adipocitos se ha postulado su biogénesis también en la membrana plasmática [118].

El mecanismo de formación de los CLs no se ha demostrado experimentalmente, posiblemente debido a que el tamaño inicial de los CLs, que se ha postulado podría ser de alrededor de 20nm [225], estaría muy por debajo de la resolución de la microscopía óptica. El modelo más aceptado consiste en la acumulación de TAG en la bicapa del RE dando lugar a la formación del CL naciente, aunque también se ha postulado que los CLs podrían sintetizarse en regiones adyacentes al RE (modelo de “huevo y copa”), a partir de vesículas, o en la membrana plasmática. Así, múltiples modelos han sido postulados, aunque ninguno de ellos ha sido suficientemente probado experimentalmente [1, 8]. A continuación se explican algunos de ellos, haciendo especial énfasis en el modelo de biosíntesis en el RE, el más aceptado por los diferentes autores.

### 3.1.1 Acumulación de lípidos en la membrana del RE

La hipótesis más aceptada para la formación de los CLs consiste en la acumulación de lípidos neutros dentro de la bicapa del RE. Al tratar células en cultivo con AGs, se observa la aparición de pequeños depósitos de lípidos neutros a lo largo de los túbulos del RE [8, 226]. Según este modelo, la acumulación progresiva de lípidos neutros promovería la formación de una estructura en forma de lente que al llegar a un tamaño crítico se separaría del RE [1, 3].

Se ha demostrado la presencia de TAG en el interior de membranas donde su acumulación formaría agregados desordenados y móviles. Las simulaciones muestran que las bicapas lipídicas pueden acomodar acúmulos de TAG de 17nm de diámetro, que serían los precursores de los CLs [225]. La función de determinadas proteínas podría finalmente estabilizar estos acúmulos de lípidos permitiendo su crecimiento y la formación del CL naciente. En este sentido, se ha demostrado que la depleción de Plin2/ADRP o cPLA2 (fosfolipasa A2 citosólica) provoca la acumulación de lípidos neutros en el RE, reduciéndose la acumulación de TAG en los CLs [14, 227, 228].

Se ha propuesto que el CL naciente podría escindirse del RE por fusión de sus monocapas externa e interna alrededor del acúmulo de TAG, generando un agujero transitorio en la membrana del RE (**modelo de escisión de la bicapa del RE**) [229]. Aun así, el modelo más aceptado por los diferentes autores es el **modelo de gemación de la monocapa externa del RE** [226]. Este modelo consiste en que la acumulación progresiva de lípidos provocaría un engrosamiento de la monocapa externa del RE conteniendo los lípidos neutros hasta separarse de este orgánulo, quedando formada tan solo por fosfolípidos procedentes de la monocapa externa [1, 8, 37]. Aunque no se ha demostrado que los CLs maduros mantengan la continuidad de membrana con el RE, cabe la posibilidad que los CLs maduros permanezcan en contacto con este orgánulo [8, 14, 226].

Una bicapa lipídica puede albergar hasta un 3% de TAG en forma soluble, como sucede en la membrana plasmática de células proliferantes. En estos casos, se ha propuesto que los TAG formarían una estructura discooidal de aproximadamente 20nm muy móvil. Esta estructura permitiría transportar, por la bicapa, lípidos sintetizados en regiones distantes, y tendría la capacidad de curvar la membrana aunque tan solo sería estable durante períodos de tiempo muy cortos [225]. La estabilización de esta estructura requeriría del reclutamiento de diferentes especies de fosfolípidos con estructuras determinadas en localizaciones concretas de la membrana del RE, generando la curvatura de la membrana necesaria para estabilizar la acumulación de TAG y permitir su crecimiento [230]. En este proceso se acumularían fosfolípidos con forma de cono invertido (lisofosfolípidos, PI, PS) en la monocapa del CL naciente mientras que los lípidos con forma cilíndrica (PC) o cónica (PE, PA, DAG) quedarían fuera de esta estructura. La cPLA2 genera lisofosfolípidos (liso-PA y liso-PC), con forma de cono invertido, a partir de fosfolípidos (PA y PC) y juega un papel esencial en la biogénesis de los CLs [228, 231-234]. Así, la acumulación local de lisofosfolípidos en la monocapa externa

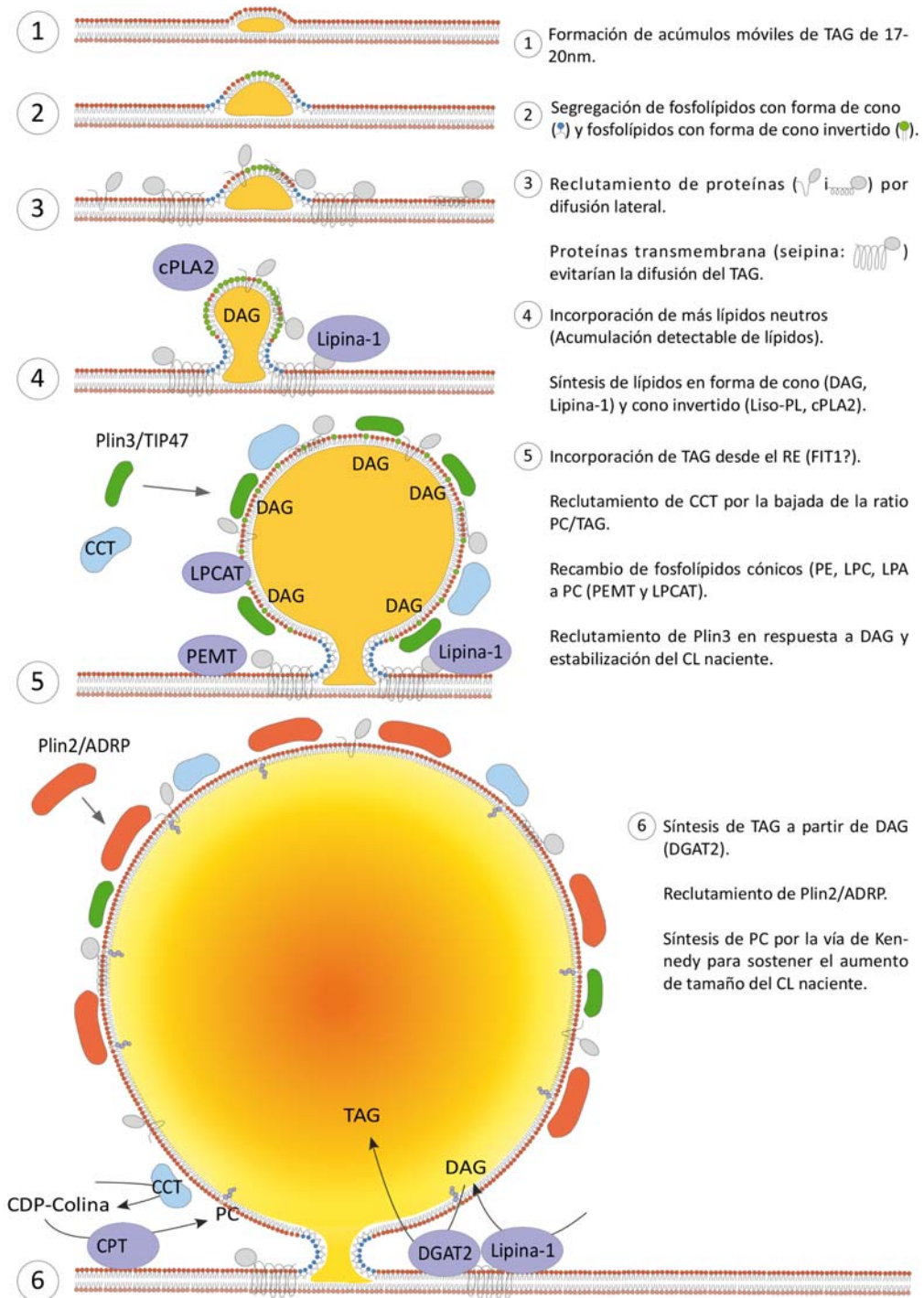


Figura 6. Modelo de síntesis de CLs por gemación de la monocapa externa del RE.

del RE alrededor de los TAG podría promover la formación del CL naciente.

Además, la fosfatidiletanolamina (PE) se acumularía en la base del CL naciente, en la zona de contacto con el RE y su estructura en forma de cono permitiría la formación de una evaginación estable de la monocapa externa de la membrana del RE y consecuentemente la formación del CL naciente encarado hacia el citosol [30]. Una vez formados y estables, la maduración de los CLs correlacionaría con la conversión de PE a PC [30]. Algunas proteínas transmembrana implicadas en el contacto entre CL y RE, como seipina, podrían evitar la difusión de TAG hacia el RE desde el CL naciente [1].

Durante la formación del CL, la estructura inicialmente acumularía DAG mediante la acción de la lipina-1. El DAG formado por ésta estimula la biogénesis de CLs independientemente de la formación de TAG [235] pudiendo afectar a la activación de la cPLA2 [50] o, debido a su forma cónica, tener un papel estructural en la formación de la evaginación de la monocapa, similar al de la PE. Una vez formado, el DAG se iría convirtiendo en TAG mediante la DGAT presente en el CL o en el RE circundante [55]. Finalmente, el CL naciente se estabilizaría mediante el reclutamiento de proteínas PAT como Plin3/TIP47, Plin4/S3-12 o Plin5/OXPAT que reconocerían los acúmulos iniciales de DAG [97] y posteriormente por otras como Plin2/ADRP que marcaría CLs más maduros [1, 236]. En este sentido, la depleción de Plin3/TIP47 bloquea la maduración de los CLs y reduce la incorporación de lípidos en éstos [99].

### **3.1.2 Modelo del “huevo y la copa”**

Este modelo alternativo propone que los CLs se formarían en una depresión del RE pero separados de éste, quedando reposando en la depresión del RE con gran acumulación de Plin2/ADRP del mismo modo que un huevo en una copa, en el que el RE envolvería el CL naciente por un lado. Los lípidos se irían transportando desde el RE llenando el CL, aunque no está definida la forma en que lo harían [237, 238].

Hay que tener en cuenta de todos modos que los artículos que apoyan este modelo no muestran CLs formados recientemente, simplemente muestran contactos entre CLs y RE en los que se observa RE envolviendo CLs. Las imágenes mostradas no permiten descartar que, aparte de ser envueltos por el RE, los CLs

mantengan continuidad de membrana en determinados puntos con éste [1, 8].

### **3.1.3 Acumulación de TAG en vesículas**

También se ha propuesto que la formación de los CLs podría darse por la acumulación de lípidos en el interior de la bicapa que delimita una vesícula hasta llegar a llenar todo su interior reduciendo el lumen de la vesícula a su mínima expresión. La vesícula inicial entraría en contacto con el RE y se iría llenando de lípidos neutros. Este modelo podría explicar la alteración de la formación de CLs al silenciar proteínas implicadas en el tráfico vesicular [8, 37].

### **3.1.4 Biogénesis de CLs en la membrana plasmática**

La presencia de TAG en la membrana plasmática se ha detectado en diferentes modelos [239, 240]. Además, en un artículo publicado por Ost y colaboradores, se ha propuesto que los adipocitos podrían sintetizar TAG en la membrana plasmática, de un modo similar a lo que sucede en procariotas [8]. Dicha síntesis se llevaría a cabo en una subclase de caveolas que contienen Plin1/Perilipina y enzimas de síntesis de TAG en la membrana de los adipocitos [128]. Hay que tener en cuenta que en este modelo celular alrededor de un tercio de la membrana plasmática está recubierto por caveolas, proporción mucho mayor que en la mayoría de tejidos. Además, la mayor parte del citosol está ocupado por un gran CL de manera que la membrana queda cercana a éste. Los CLs generados en estas caveolas, envueltos en caveolinas, podrían direccionarse al CL central representando una vía de transporte de caveolina hacia el CL directamente desde la membrana [118]. Apoyando esta hipótesis, se han detectado proteínas PAT en la membrana plasmática de adipocitos y se ha propuesto que los CLs incorporarían estas proteínas desde dominios especializados de ésta [241, 242].



## 3.2 Maduración de los CLs

La inducción de CLs mediante la adición de ácido oleico en el medio genera la formación de CLs pequeños por toda la célula. Durante su maduración, estas estructuras incrementan progresivamente de tamaño y se agregan formando clústeres a menudo perinucleares [23, 243]. Una vez formados, los CLs crecen hasta llegar a su tamaño final, que es diferente según la condición y el tipo celular.

Los CLs nacientes tienen un tamaño muy reducido que puede incrementar mediante dos mecanismos: la incorporación de lípidos a los CLs ya formados y la fusión entre CLs.

### 3.2.1 Incorporación de ácidos grasos a los CLs

Los CLs pueden incorporar AGs por diferentes vías: mediante **proteínas transportadoras**, por **contacto directo con la membrana del RE** o a través de la **síntesis de TAG *in situ***.

El primer mecanismo propuesto (Figura 7, 2) sería similar al que actúa en la síntesis de lipoproteínas, donde existen proteínas implicadas en la transferencia de los TAG desde la bicapa del RE hacia el lumen de este orgánulo. Aun así, mecanismos similares no se han descrito por el momento para la transferencia de lípidos del RE hacia los CLs.

La transferencia de TAG desde su síntesis en el RE también podría darse mediante **contactos permanentes entre los CLs y este orgánulo** (Figura 7, 1). En este sentido, se ha propuesto que los CLs se mantienen en contacto con el RE, pero dicha continuidad tan solo se ha observado sólo de forma esporádica mediante microscopía electrónica [8, 14, 43].

Los CLs también pueden crecer por incorporación de **TAG sintetizados en las proximidades de su superficie**, a partir de DAG procedente de los CLs [55] (Figura 7, 3). Se ha demostrado la capacidad de los CLs aislados de sintetizar lípidos neutros [168]. Además, recientemente se ha descrito la presencia en los CLs de al menos una isoforma de todas las enzimas implicadas en la síntesis de TAG. En este trabajo, los autores demuestran que la síntesis local de TAG en los CLs promovería el incremento de tamaño, específicamente en aquellos CLs de la cé-

lula que albergan la maquinaria de síntesis de TAG [46, 55]. Así, la incorporación de TAG sintetizados en los propios CLs podría ser un importante mecanismo para el crecimiento de éstos. Este fenómeno se ha observado durante la biogénesis de CLs en adipocitos post-lipolíticos [245], seguramente por incorporación de AGs.

Los CLs de fibroblastos parecen incorporar TAG a una tasa uniforme mientras que los CLs de adipocitos incorporan TAG a diferente velocidad entre los diferentes CLs, sugiriendo un diferente grado de contacto entre el RE y los CLs y/o un reclutamiento diferencial de la maquinaria de síntesis, por ejemplo DGAT2 [38, 55].

Independientemente del origen de los TAG incorporados a los CLs, el proceso de maduración requiere de la incorporación de fosfolípidos a medida que el CL va incrementando de tamaño. Como se ha explicado anteriormente, el contenido de fosfatidilcolina de los CLs regula la unión de la CCT (paso limitante en la síntesis de este fosfolípido) a los CLs activando así la síntesis de ésta.

### 3.2.2 Fusión entre CLs

La relevancia de la fusión entre CLs como mecanismo de crecimiento de éstos es controvertida. Los estudios por videomicroscopía muestran que este proceso sería muy poco frecuente en situaciones fisiológicas, incluso en situaciones donde los CLs forman clústeres muy densos presionándose entre sí [3, 43], exceptuando situaciones artefactuales causadas por concentraciones excesivas de determinadas drogas [244]. Aun así, se ha observado la **fusión homotípica completa** (entre CLs similares) durante la biogénesis de CLs que se da en situación post-lipolítica en adipocitos [245]. La fusión completa (Figura 7, 5), si se lleva a cabo entre CLs de similar tamaño, generaría un exceso de fosfolípidos producto de la fusión cuyo destino se desconoce, aunque podría explicar la presencia de estructuras membranosas observadas en el núcleo de algunos CLs [3, 246]. Este mecanismo también podría ser el empleado para transportar los lípidos neutros sintetizados en las caveolas a los grandes CLs de adipocitos [28].

Recientemente se ha observado CLs creciendo a expensas de otro CL con el que están en contacto, con el trasvase de lípidos entre ellos a través del punto de contacto, y por lo tanto de una **“fusión parcial”** de sus monocapas [245, 247, 248] (Figura 7, 4). Este mecanismo de fusión, al ser un mecanismo de fusión más lento permitiría el remodelamiento de los fosfolípidos de los CLs participantes,

para mantener la estabilidad de la monocapa. Se ha descrito que dicho incremento de tamaño reduce el reclutamiento de lipasas como ATGL a los CLs, reduciendo la lipólisis, tanto basal como estimulada por hormonas [249].

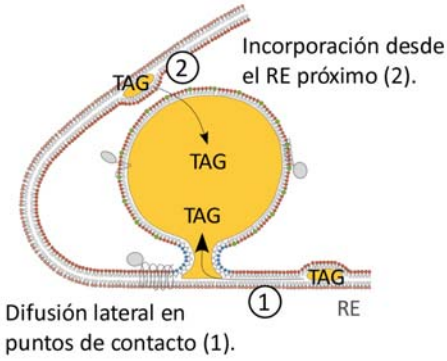
La fusión entre CLs podría ser el mecanismo por el que se forma el gran CL unilocular de los adipocitos o los CLs de gran tamaño observados en hepatocitos durante la esteatosis. Aun así, la fusión probablemente no sería el mecanismo preferencial de crecimiento de los CLs en células con acumulaciones de lípidos mucho más reducidas [226].

La fusión entre CLs está regulada por proteínas de la familia Cide (*cell death-inducing DFF45 effector*), la más estudiada de las cuales es CideC/Fsp27. **CideC/Fsp27** se expresa mayoritariamente en adipocitos y en hígados esteatóticos [250], y su expresión correlaciona con el tamaño de los CLs, implicándola en los mecanismos de maduración [251, 252]. Recientemente se ha descrito que CideC/Fsp27 se localiza en los contactos entre CLs por donde se produciría trasvase de lípidos. Este trasvase sería unidireccional permitiendo el crecimiento de uno de los CLs a expensas del otro [245, 247], por lo tanto, esta proteína estaría implicada en la “fusión parcial” de CLs mencionada anteriormente (Figura 7, 4). En adipocitos este tipo de fusión sería necesario para la formación del gran CL unilocular y está regulado por la interacción de CideC/Fsp27 con Plin1/Perilipina [253, 254]. Los ratones deficientes en CideC/Fsp27 tienen adipocitos con múltiples CLs en vez de uno solo, y consecuentemente una mayor lipólisis [250].

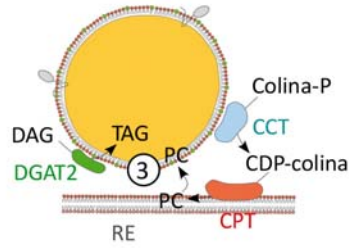
La proteína **CideA**, de la misma familia que CideC/Fsp27, también se localiza en CLs [255] y su sobreexpresión promueve la acumulación de lípidos y la formación de menos CLs pero de mayor tamaño [256]. Esta proteína modula la acumulación de lípidos durante la esteatosis hepática [257]. Los CLs nacientes en hepatocitos interaccionan con los CLs maduros de forma transitoria. Estas interacciones transitorias permitirían la transferencia de lípidos desde los CLs nacientes al núcleo de los CLs maduros de forma gradual sin llegar a observarse procesos de fusión completa [236]. Aunque se desconoce cómo, la lipasa TGH participa en este mecanismo puesto que la depleción de ésta en hepatocitos reduce el trasvase de lípidos entre CLs nacientes y maduros [236].

El otro miembro de la familia Cide, **CideB**, se localiza en el RE y CLs y también estaría implicado en la transferencia de lípidos desde los CLs pero hacia el RE, para la formación de VLDL, interaccionando con la apolipoproteína ApoB [258].

**A) Incorporación de TAG desde el RE:**

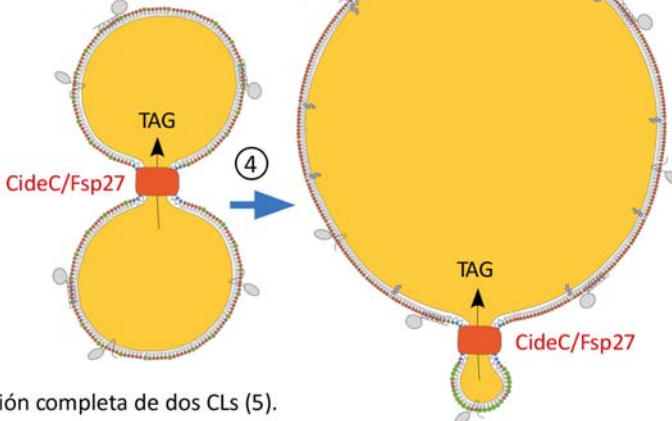


**B) Síntesis de lípidos en los CLs (3):**



**C) Fusión entre CLs:**

Trasvase de lípidos entre dos CLs fusionados parcialmente (4).



Fusión completa de dos CLs (5).

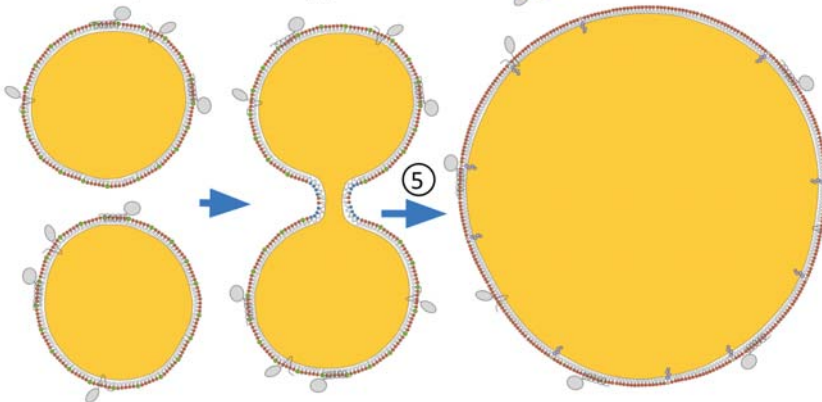


Figura 7. Mecanismos de maduración de los CLs.

Otro elemento importante en la regulación de la fusión entre CLs parece ser la composición de la **monocapa de fosfolípidos**. Como se ha comentado anteriormente, la fosfatidilcolina evitaría la fusión entre CLs adyacentes [23-25], mientras que incrementos en la cantidad de ácido fosfatídico (PA) facilitan la fusión de CLs en contacto generando CLs de gran tamaño. Este incremento en PA se da en levaduras deficientes en seipina, proteína situada en los contactos entre RE y CLs, o en mutantes de lipina [26, 259]. Durante la maduración de los CLs, el PA se generaría a partir de fosfatidilcolina por la PLD (fosfolipasa D) [260], reclutada en los CLs mediante el sistema Arf1/COPI [186], y promovería la acumulación de CLs [261]. EL PA, además de promover la fusión por sí mismo, también podría activar las proteínas SNARE, implicadas en la fusión de vesículas, que también se han relacionado con la fusión entre CLs [27], aunque queda por clarificar el mecanismo por el cual mediarían la fusión entre monocapas [1, 8]. El reclutamiento de proteínas **SNARE** a los CLs en adipocitos podría estar regulado por la proteína  $\gamma$ -sinucleína, altamente expresada en estas células [262].

### 3.3 Otros reguladores de la acumulación de CLs

Además de las proteínas implicadas en el proceso de biogénesis y maduración comentadas anteriormente y las proteínas implicadas en la síntesis de TAG, se han descubierto diferentes proteínas importantes para la acumulación de CLs.

Las proteínas FIT (*Fibrate Induced Transcript*): **FIT1/FITM1** y **FIT2/FITM2** son proteínas integrales de membrana del RE mayoritariamente expresadas en músculo esquelético y tejido adiposo respectivamente. Su depleción reduce la acumulación de TAG y su sobreexpresión la eleva, incrementando el tamaño de los CLs, sin afectar a la síntesis de TAG, de modo que promoverían el direccionamiento de TAG en los CLs [263]. De forma interesante, recientemente se ha descrito su capacidad de unir TAG y DAG, aunque de manera diferencial, teniendo FIT2/FITM2 más afinidad por éstos, esta mayor afinidad correlacionaría con un mayor efecto sobre la incorporación de TAG y el tamaño de los CLs [264]. Sus diferencias de expresión en tejidos y el hecho que la sobreexpresión de FT2/FITM2 genera CLs de mayor tamaño han llevado a especular que FIT1/FITM1 promovería la formación de CLs destinados a su consumo en el músculo mientras que FIT2/FITM2 promovería el almacenamiento de lípidos en el tejido adiposo [3, 8, 28].

Recientemente se ha descrito un papel de la proteína **atlastina**, implicada en la regulación de la estructura del RE, en el control del tamaño de los CLs [265].

Por otro lado, la **iPLA2** (fosfolipasa A2 independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  del grupo VIA) también se ha implicado en la síntesis de CLs. Esta enzima cataliza la hidrólisis de fosfolípidos como fosfatidilcolina o ácido fosfatídico hacia lisofosfolípidos permitiendo el recambio de las cadenas de AGs en éstos, en el ciclo de Lands. La iPLA2 promueve la acumulación de CLs en respuesta a determinados tipos de estrés [266] (explicada posteriormente).

La expresión de **LC3** (*Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*), implicada en la síntesis de la membrana inicial de los autofagosomas, promueve la biogénesis de los CLs, dado que su depleción reduce la formación de CLs y la síntesis de TAG en diversas líneas celulares [267]. Otras proteínas implicadas en la autofagia como Atg5 serían importantes para la acumulación de lípidos durante la adipogénesis [268].

Aparte de las proteínas anteriormente especificadas, recientemente los **microRNAs** también se han implicado en la regulación de la acumulación de CLs. En un estudio reciente se encontraron 11 microRNAs cuya expresión alteraba el contenido de CLs [269]. Además, en otros estudios se ha demostrado el papel del microRNA-27 en la modulación de la acumulación de CLs en células estrelladas [270] y en la esteatosis inducida por el HCV [271].



# ACUMULACIÓN DE CUERPOS LIPÍDICOS Y FUNCIONES ASOCIADAS

La acumulación de CLs se ha descrito en respuesta a múltiples situaciones como el exceso de AGs, el estrés celular, la disfunción mitocondrial, la hipoxia, la apoptosis e incluso en respuesta a determinados patógenos. A continuación se detallan estas situaciones y la función de los CLs en cada caso

## 4.1 Exceso de ácidos grasos y lipotoxicidad

El principal y más conocido estímulo para la formación de CLs es el aporte en exceso de AGs externos. La capacidad de inducción de la formación de CLs es muy diferente según la clase de AG. Los AGs insaturados, como el ácido oleico (AO), promueven fácilmente la formación de CLs, mientras que los AGs saturados como el ácido palmítico (AP) o el ácido esteárico (AE) tienen una capacidad de formar CLs muy baja, gran parte de la cual reside en la síntesis de AGs insaturados a partir de éstos por parte de las esteroil-CoA desaturasas [272, 273].

La principal función de la síntesis de CLs en respuesta a AGs es evitar la lipotoxicidad. El tratamiento con AG saturados (AP o AE) provoca apoptosis en células pancreáticas [274-278], cardiomioblastos [279], células de ovario [280], preadipocitos [281], células musculares [282] y hepatocitos [273, 283-286]. Los AGs insaturados promueven la esterificación de los AGs saturados, protegiendo a las células de sus efectos tóxicos.

A continuación detallamos los mecanismos descritos por los que los AGs promueven lipotoxicidad, así como las vías por las que algunos AGs protegen frente a ésta (Figura 8).

### 4.1.1 Lipotoxicidad de los AGs

Se han propuesto diversos mecanismos por los cuales los AGs provocarían lipotoxicidad:



### **Estrés de retículo**

El estrés de RE consiste en la acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del retículo que posteriormente serán exportadas al citosol para su degradación mediante proteasoma durante la respuesta a proteínas mal plegadas. El estrés de retículo sostenido acaba provocando la muerte celular por apoptosis [287].

El AP provoca estrés de retículo en células pancreáticas [274, 275, 277], en células hepáticas [286], en preadipocitos [281] y en células de ovario [279]. Este **AG se incorpora rápidamente en fosfolípidos, DAG y TAG**, acumulándose dichas especies con AGs saturados en el RE. Esta acumulación altera la estructura e integridad de este orgánulo aumentando su permeabilidad [275, 280, 287]. Además, los AGs saturados **se intercalan en la membrana del RE** pudiendo mediar en parte esta alteración (Figura 8, A). La mayor permeabilidad de la membrana del RE facilitaría la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  de este orgánulo [280] y consecuentemente defectos en el plegamiento de proteínas, generando estrés de retículo [280, 287]. Además, la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE es un evento clave para activar la apoptosis por la vía mitocondrial en respuesta a estrés de RE (Figura 8, B). Se ha postulado que los CLs podrían tener un efecto protector sobre el estrés de retículo a través del secuestro de iones de calcio en su superficie [287]. También se ha descrito que la inhibición de la **palmitoilación de proteínas** reduce el estrés de retículo y la apoptosis en respuesta a AP [277], por lo que parte del estrés de RE observado podría deberse a una palmitoilación aberrante de proteínas (Figura 8, C).

Aparte de los AGs saturados, los AGs insaturados, como el AO, también muestran cierta lipotoxicidad, además de su efecto protector sobre la lipotoxicidad causada por el AP (explicado más adelante). Se ha descrito que el tratamiento con AO provoca apoptosis en células pancreáticas [274, 276, 288], aunque en menor grado que el AP. En estas células la sobreexpresión de la chaperona GRP78 protegería de la muerte inducida por AO [288] indicando un posible papel del estrés de retículo endoplasmático en esta apoptosis. En este sentido, se ha observado que el AO provoca estrés de retículo en células pancreáticas [274] (Figura 8, D). También se ha detectado apoptosis asociada al tratamiento con AO en fibroblastos [289] y neuronas [290].

La menor lipotoxicidad del AO respecto al AP [276] depende de la capacidad de esterificación de las células (Figura 8, E). Cuando ésta se encuentra comprometida, la lipotoxicidad del AO es similar a la del AP [272, 276, 287, 291].

### ***Estrés oxidativo y alteración mitocondrial***

El AP genera un incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS) en múltiples tipos celulares [279, 282, 284, 292] y en mitocondrias de músculo [293]. En algunos de estos casos se ha demostrado que la apoptosis mediada por AP es parcialmente dependiente de ROS [279].

En células musculares se ha descrito que dicha acumulación de ROS depende de la síntesis de **ceramidas** [282] (Figura 8, F). La acumulación excesiva de estos lípidos promueve la producción de ROS en la mitocondria y la permeabilización de la membrana mitocondrial previa a la apoptosis. Inhibidores de la síntesis de ceramidas reducen la apoptosis inducida por AP y, de forma interesante, el tratamiento con AGs insaturados previene de la apoptosis debida a AP y ceramidas [294].

También se ha asociado el incremento de ROS a la  **$\beta$ -oxidación de AGs** en la mitocondria [293], por lo que en algunos casos parte del ROS asociado al tratamiento con AP se debería a su oxidación (Figura 8, G). Dicho ROS contribuiría también a parte del estrés de retículo [279] (Figura 8, H) y posiblemente también [282] a la disfunción mitocondrial observada en respuesta a AP en diferentes modelos celulares [273, 282, 284, 295] (Figura 8, I).

Se ha descrito que el AO también provoca un incremento de ROS [288, 296-298] y lo haría por dos vías; mediante la  $\beta$ -oxidación mitocondrial [298] (Figura 8, J) y mediante la activación de la NAD(P)H oxidasa [289, 296-298] (Figura 8, K) que promueve la producción de ion superóxido en la membrana plasmática.

### ***Resistencia a la Insulina***

Cuando están formados por cadenas de AG saturados, los DAG y algunos fosfolípidos activan en mayor medida la quinasa **PKC**, interfiriendo en la señalización de insulina. Mediante este mecanismo los AGs saturados generarían resistencia a la insulina [287]. También se han implicado las ceramidas en este proceso [294] (Figura 8, punteado rojo). La acumulación de CLs en las células frecuentemente se ha relacionado con la resistencia a insulina. Aun así, el incremento de la acumulación de CLs, mediante la sobreexpresión de DGAT2 o Plin2/ADRP en ratones, no genera resistencia a insulina (en hígado y músculo respectivamente) [37, 299], por lo que ambos procesos no estarían directamente relacionados.

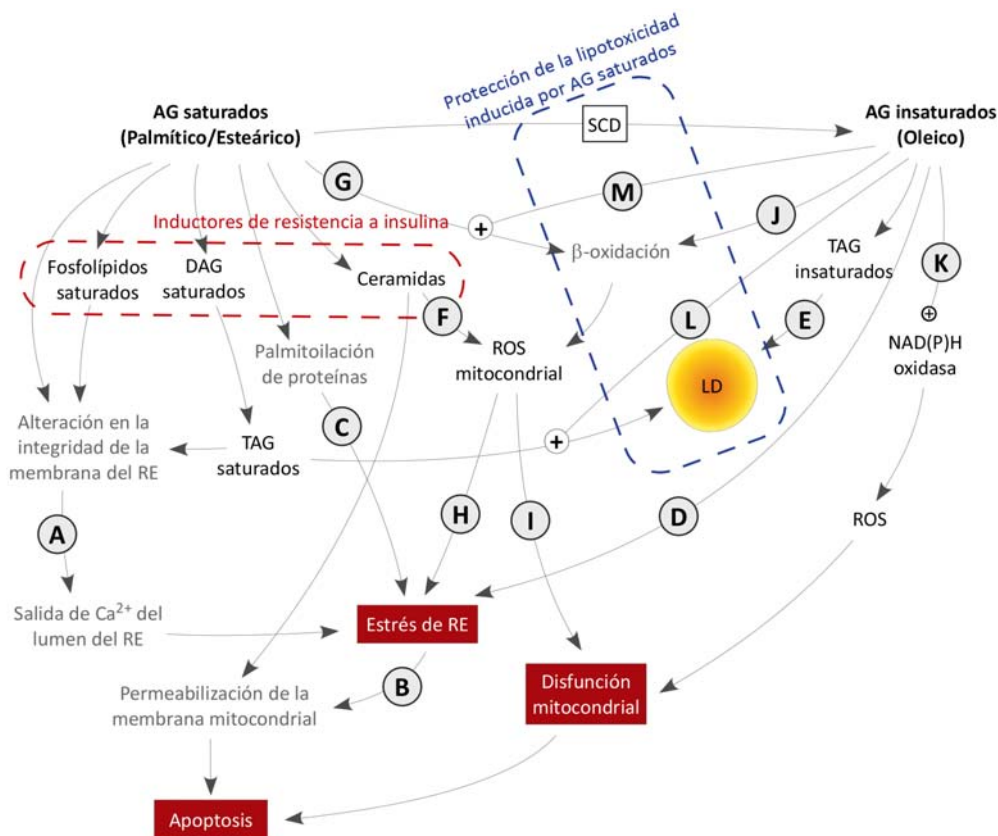


Figura 8. Mecanismos por los que los AGs generan lipotoxicidad.

#### 4.1.2 Efecto protector del AO sobre la lipotoxicidad

El tratamiento con AO inhibe la apoptosis inducida por AE [285] y AP [272, 276, 282, 292, 300]. Se han descrito dos mecanismos por los que mediaría este efecto protector, promoviendo la esterificación y la β-oxidación de AGs saturados.

##### **Esterificación del AP en CLs**

El AO promueve la esterificación de AGs de cadena saturada en TAG y su almacenamiento en CLs [272] (Figura 8, L). El direccionamiento del AP hacia la síntesis de TAG mediado por el AO reduce la síntesis de ceramidas y también la producción de ROS [272]. En este sentido, el co-tratamiento con AO también reduce la dis-

función mitocondrial provocada por el AP [282]. Otro ejemplo de protección de la lipotoxicidad mediante la esterificación se da en macrófagos, donde para evitar que promueva estrés de retículo y apoptosis el colesterol libre es acumulado en CLs en forma de ésteres de colesterol [200]. Así, la acumulación de CLs sería el principal mecanismo de lucha contra la lipotoxicidad [299].

### ***β-oxidación mitocondrial del AP***

El AO también promueve la β-oxidación del AP incrementando la síntesis de su transportador hacia el interior de la mitocondria, la carnitina palmitoil transferasa-1 (CPT1) [276, 292, 300] (Figura 8, M). La β-oxidación mitocondrial de AP, de forma controlada, previene de la producción de ROS, la disfunción mitocondrial y la lipotoxicidad asociada a éste [275, 277, 280, 284, 300] reduciendo la disponibilidad de AP para la síntesis de otros lípidos como ceramidas y DAG.

## **4.2 Estrés celular**

Los CLs se acumulan en condiciones de estrés celular muy diferentes, por lo que su formación se puede considerar una respuesta generalizada al estrés [287] que, de forma importante, suele suceder sin aporte externo de AGs.

La acumulación de CLs en respuesta a estrés se ha demostrado frente al estrés osmótico [301], estrés por pH ácido, estrés de retículo o ayuno de glucosa [266]. En estos casos dicha acumulación depende de la participación de la **iPLA2** (fosfolipasa A2 insensible a calcio). Esta fosfolipasa degrada fosfolípidos obteniéndose lisofosfolípidos, que facilitarían la curvatura de membrana necesaria para la biogénesis de CLs, y AGs que serían usados para la síntesis de TAG. Así, en respuesta a estrés, las células sintetizarían CLs a partir de fosfolípidos, a falta de aporte externo de AGs.

En la acumulación de CLs en respuesta a estrés también podrían tener un papel las SAPK (quinasas de respuesta a estrés) **p38** y **JNK**. La activación de estas quinasas por el ácido araquidónico promueve la activación de cPLA2 y la síntesis de CLs en monocitos [232], por lo que no se puede descartar que otros tipos de estrés que provoquen la activación de las SAPK activen la síntesis de CLs por este mecanismo.

### 4.2.1 Estrés de retículo endoplasmático

En el apartado anterior hemos visto que determinados AGs provocan estrés de retículo y que los CLs protegerían a la célula frente a este estrés. Además, la inducción de estrés de retículo por distintas vías provoca la acumulación de CLs en cultivo [183, 259, 302] y en ratones *in vivo* [287, 303] y su resolución mediante chaperonas previene dicha acumulación [287]. Los CLs tendrían un efecto protector frente a dicho estrés. Por ejemplo, la expresión de una forma mutada de seipina provoca estrés de retículo y el tratamiento con AO promueve la acumulación de CLs en estas células y la translocación de la proteína mutada a éstos, reduciendo el estrés de retículo [304].

El mecanismo mediador de dicha inducción no se conoce en profundidad, pero se ha descrito que el estrés de retículo incrementa la expresión de ACSL3, que es esencial para la acumulación de CLs en esta situación [183]. Además, también incrementa la expresión de iPLA2 [305] y genes implicados en la lipogénesis [303], y, en el hígado de ratones, reduce la de genes implicados en la  $\beta$ -oxidación [306], relacionando al estrés de retículo con la esteatosis no alcohólica [303, 307].

Como hemos comentado anteriormente, los CLs contienen chaperonas y además se especula que podrían servir como almacén temporal de proteínas y participar en su degradación, por lo que una posible función de los CLs en respuesta al estrés de RE podría ser la degradación de proteínas mal plegadas [287].

Recientemente se ha observado que en situación de estrés de retículo, los adipocitos activan la lipólisis [308]. El estrés de RE sostenido en adipocitos, incrementaría la cantidad de AGs circulantes trasladando la lipotoxicidad a otros tejidos. Como se verá más adelante gran parte de los AGs procedentes de la activación de la lipólisis en adipocitos son re-esterificados en CLs formados *de novo*. Así, podría ser que el efecto protector frente al estrés de retículo no lo ejercieran los CLs *per se* sino el proceso de biogénesis de éstos, dado que durante este proceso los CLs estarían en contacto permanente con el RE facilitando la re-localización de proteínas desde éste.

### 4.2.2 Estrés osmótico

Recientemente se ha observado la acumulación de CLs en respuesta a estrés

osmótico. Se ha especulado que podría ser debido a la necesidad de metabolizar el exceso de fosfolípidos intracelulares que causaría la internalización de membrana necesaria para la reducción del tamaño de la célula en respuesta a un ambiente hiperosmótico [301].

### 4.2.3 Ayuno de nutrientes

El ayuno de nutrientes provoca la acumulación de CLs en células de glioblastoma, astrocitos, células HeLa, células de ovario y neuronas en cultivo, especialmente en neuronas procedentes de ratas hembra, de forma dependiente de la cPLA2 [233, 234]. En estos casos, los AGs acumulados serían destinados a la  $\beta$ -oxidación mitocondrial que sería necesaria para la supervivencia frente a este estrés [233].

## 4.3 Disfunción mitocondrial

La acumulación de CLs en situaciones de disfunción mitocondrial se ha demostrado en células apoptóticas [309], en hígado de ratón [310] y en músculo. También se ha observado una correlación entre el daño mitocondrial y la acumulación de CLs en células tumorales tratadas con determinados agentes quimioterapéuticos [311].

Además, en células con mitocondrias funcionales, **la inhibición de la cadena respiratoria** mediante inhibidores de sus complejos también provoca la acumulación de CLs [309, 312-314]. También se ha especulado que la inducción de la acumulación de CLs en el músculo durante la caquexia tumoral [315] sería debida a una disfunción de la cadena respiratoria observada en estos casos [316].

El **impedimento de la  $\beta$ -oxidación** mitocondrial de AGs conlleva un incremento en la acumulación de CLs en células ES [317], en células estrelladas del hígado [318], en hígado y músculo de rata [319], en músculo y en células tumorales [312], probablemente como consecuencia de un incremento de la concentración de AGs libres en el citoplasma.

Así, probablemente, la causa de la acumulación de CLs en situaciones de disfunción mitocondrial sería una disminución en la capacidad de  $\beta$ -oxidación de las

células. Finalmente la disfunción mitocondrial observada en personas obesas las predispondría a tener un elevado contenido de CLs en el músculo [320].

## 4.4 Hipoxia

Otra situación en la que el metabolismo mitocondrial se ve comprometido es la hipoxia, con una inhibición de la cadena respiratoria y de la  $\beta$ -oxidación [321]. Consecuentemente se ha observado la acumulación de CLs en respuesta a este tipo de estrés [321-323]. El factor de transcripción más importante en respuesta a hipoxia es **HIF-1** y se ha visto que en respuesta a hipoxia induce la expresión de lipina-1 y de HIG2, ambas importantes en la acumulación de CLs frente a este estrés [322, 323].

Además, se ha observado la sobreexpresión de **HIG2** en lesiones ateroscleróticas, donde los macrófagos se ven frecuentemente sometidos a hipoxia y acumulan gran cantidad de CLs [322, 324]. En estas células, la hipoxia promueve la sobreexpresión de Plin2/ADRP y la reducción de la expresión de enzimas implicadas en la  $\beta$ -oxidación [321]. Aunque se ha descrito que los lípidos acumulados por estas células derivan del metabolismo de la glucosa [325].

La hipoxia también se suele dar en determinadas regiones de tumores sólidos y se ha observado que en estos casos también correlaciona con un incremento en la acumulación de CLs [326].

## 4.5 Apoptosis

Se ha observado una acumulación de TAG durante la apoptosis en gliomas [327], y la acumulación de CLs en células Jurkat en etapas iniciales de la apoptosis, que correlaciona con una disminución de los niveles de PC [328]. Así, durante la apoptosis se podría estar promoviendo la síntesis de TAG a partir de fosfatidilcolina vía iPLA2 como en otros tipos de estrés. De hecho, la inducción de la apoptosis vía Fas activa PLA2.

La acumulación de CLs en apoptosis también podría deberse a una inhibición del metabolismo mitocondrial de los AGs. En esta línea, recientemente se ha

descrito que la acumulación de CLs durante el inicio de la apoptosis se debería a la inhibición de la  $\beta$ -oxidación mediada por el estrés oxidativo que provocaría el direccionamiento de AGs a TAG [309]. Se ha propuesto que en células dañadas, con un incremento de ROS y la consecuente inhibición de la  $\beta$ -oxidación, la acumulación de CLs prevendría de los efectos tóxicos de la acumulación de AGs libres [309]. Además, la acumulación de CLs en células apoptóticas activaría, una vez fagocitadas, su degradación por parte de macrófagos evitando una mayor inflamación [329].

## 4.6 Patógenos

La acumulación de CLs es un proceso frecuente en respuesta a diferentes infecciones y condiciones inflamatorias como la aterosclerosis, sepsis bacteriana, infecciones víricas e infecciones de micobacterias. La formación de CLs en respuesta a patógenos se ha demostrado en infecciones de **bacterias** (de géneros como *Acinetobacter*, *Chlamydia*, *Escherichia*, *Kleibsell*, *Mycobacterium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Vibrio*), en **virus** (virus del Dengue o de la hepatitis C) y en **parásitos** (de géneros como *Leishmania*, *Plasmodium*, *Schistosoma*, *Toxoplasma* y *Tripanosoma*) [330].

### 4.6.1 Infecciones víricas

La acumulación de CLs en respuesta a virus se ha estudiado principalmente en el virus de la hepatitis C (HCV). Algunas proteínas de este virus como la proteína *core* (de su cápside) se localizan en los CLs [331] y reducen el metabolismo de éstos, además de promover su localización perinuclear [332]. Se ha propuesto que las partículas de este virus se ensamblarían en los contactos entre CL y RE [333] y el silenciamiento de la expresión de Plin3/TIP47 bloquea este proceso [334].

Poniendo de relevancia el papel crucial de los CLs en el ciclo vital de muchos virus, la inhibición de la síntesis de CLs inhibe la proliferación del virus del Dengue, del HCV y de rotavirus [335-337].

Los CLs también tendrían una función antivírica, la proteína viperina se loca-



liza en estos orgánulos en células dendríticas inhibiendo la replicación del HCV [14] interaccionando con proteínas del virus [338].

## 4.6.2 Infecciones bacterianas

La inducción de CLs en células por parte de muchas bacterias se realiza en respuesta a componentes de la pared bacteriana como el lipopolisacárido (LPS). Esta molécula promueve la acumulación de CLs en neutrófilos [339], fibroblastos [340] y microglía [341]. El LPS promueve una cascada de señalización que activa la expresión de Plin2/ADRP y la acumulación de CLs [341].

Las placas de ateroma formadas por macrófagos con una gran cantidad de ésteres de colesterol (*foam cells*) contienen restos de bacterias, por lo que se ha especulado un papel inicial de estas infecciones en la formación de las placas de ateroma.

Además, patógenos intracelulares del género micobacteria, causantes de enfermedades como la tuberculosis o la lepra, se dividen en el interior de la vacuola de los macrófagos y promueven la acumulación de grandes cantidades de CLs, a partir de la captación de lipoproteínas, en los macrófagos infectados [342, 343]. Las vacuolas infectadas absorben CLs procedentes del citoplasma a los que las micobacterias permanecen adheridas [343]; estos patógenos, importan AGs derivados de los CLs del huésped y los incorporan en sus propios CLs [324].

Por otro lado, los CLs también ejercerían funciones antibacterianas. La NAD(P)H oxidasa es activada por lípidos y mediaría la producción de ROS en las vacuolas infectadas en macrófagos, incrementando la capacidad de matar los patógenos [330]. Por otro lado recientemente el grupo del Dr. Steven P. Gross, en colaboración con nuestro grupo, ha descrito que las histonas se localizan en CLs y se liberan de éstos en respuesta a componentes de las paredes bacterianas matando las bacterias. Este mecanismo se ha estudiado en los embriones de *Drosophila* y parece conservarse también en ratones, donde la exposición de los animales a LPS incrementaría la expresión de Histona H1 en CLs. Además, en CLs de hígado de ratón, la exposición de los CLs a LPS *in vitro* promueve la liberación de dicha histona [344].

### 4.6.3 Parásitos

Parásitos intracelulares causantes de enfermedades muy extendidas como la malaria, enfermedad de Chagas, leishmaniasis o toxoplasmosis causan también la acumulación de CLs en las células infectadas [330]. El mecanismo por el que estos organismos provocan la inducción de CLs aún no es del todo conocido y en algunos casos dependería de la síntesis *de novo* de AGs [330, 345] mientras que en otros de la captación de AGs [346].



# DINÁMICA DE LOS CUERPOS LIPÍDICOS

Excepto en células como los adipocitos maduros, con grandes CLs aparentemente estáticos, los CLs son orgánulos muy dinámicos y móviles que interactúan con otros orgánulos intracelulares [93].

## 5.1 Movimiento de los CLs

El movimiento de los CLs se ha observado en modelos tan diferentes como las hifas de hongos [9], los embriones de *Drosophila*, axones de *Aplysia* [347], o células de mamífero.

Los CLs en células en cultivo exhiben dos clases de movimiento, **rotatorio**, oscilando a corta distancia, y **saltatorio**, lineal de larga distancia con una velocidad entre 1-2,5 $\mu$ m/s en células de mamífero [70, 72, 115, 348-354].

La mayoría de CLs de la célula realizan un movimiento oscilatorio dentro de un área muy pequeña y parecen encontrarse interactuando con el RE. Aun así, algunos CLs realizan movimientos saltatorios y direccionados, y, frecuentemente se ha observado al mismo CL realizar un movimiento rápido en un sentido y posteriormente otro en sentido contrario siguiendo la misma dirección [348, 350]. En concordancia con este hecho se han observado **CLs desplazándose por microtúbulos** [354, 355], que son necesarios para dicho movimiento [72, 350-352, 355-357]. Además, el tamaño de los CLs podría determinar su movimiento; así los CLs de mayor tamaño muestran una menor movilidad [351, 355].

Las proteínas motoras asociadas a los microtúbulos, tanto las **dineínas** (proteínas motoras que transportan orgánulos hacia el extremo negativo de los microtúbulos) [358-360] como las **quinesinas** (proteínas motoras que transportan orgánulos hacia el extremo positivo de los microtúbulos) [360, 361] se han encontrado asociadas a CLs. Se ha descrito que la dineína interactúa con Plin2/ADRP [359] al ser fosforilada por la quinasa ERK2 [260]; además, la inhibición de las dineínas mediante vanadato [352, 359], inyección de un anticuerpo para neutralizarlas [260, 332] o mediante la expresión de dinamitina [353] inhibe el movimiento de los CLs. La inhibición de quinesinas también reduce la frecuencia

de movimientos saltatorios hacia la periferia [352, 361]. La dirección del movimiento no depende de la mera competencia entre la actividad de las dineínas y la de las quinesinas presentes en el CL, sino que sería un proceso coordinado por otros factores [362], como la proteína Klar en *Drosophila* [356] o el complejo de la dinactina [353], la disrupción del cual inhibe tanto el movimiento mediado por dineínas como el mediado por quinesinas [349].

Mediante estudios de proteómica además de tubulina, también se ha detectado **actina** en los CLs. La despolimerización de la actina reduce la esterificación del colesterol en macrófagos generando CLs de menor tamaño [363] y reduce la velocidad de los CLs en el desarrollo embrionario [364]. Aun así, la despolimerización del citoesqueleto de actina en células MDCK no afecta al movimiento de CLs [72]. Así, el movimiento de los CLs dependería básicamente del citoesqueleto de tubulina, aunque no se puede descartar la participación del citoesqueleto de actina en determinadas situaciones.

El movimiento de los CLs ha sido estudiado durante el **desarrollo de los embriones sincitiales de *Drosophila***, donde se encuentra finamente regulado [93, 106]. En estos embriones, los CLs se mueven de forma sincronizada desde la periferia a la región central y luego en sentido contrario. La función de este movimiento es aún desconocida, pero es un buen modelo para estudiar los factores que lo determinan [8, 332]. El movimiento de los CLs en este modelo depende de las actividades relativas de los motores moleculares anclados en éstos y está coordinado por un complejo entre la proteína de CLs Halo [365], la quinesina, la unidad reguladora Klar [356, 361, 366] y el homólogo de la familia de proteínas PAT en *Drosophila*, LSD2 (*Lipid storage droplet 2*), que determina el control del movimiento de los CLs a lo largo del desarrollo embrionario [8, 367]. En este complejo, la proteína Halo regula la fosforilación de LSD2 promoviendo el transporte mediado por quinesinas [349, 365]. La proteína BicaudalD también regula la coordinación de los motores moleculares en el movimiento de los CLs [368]. LSD2 (como sus homólogas de la familia PAT) también está involucrada en la regulación del metabolismo de CLs, dado que su sobreexpresión genera moscas obesas mientras que su depleción tiene el efecto contrario [369].

En mamíferos también se ha descrito que proteínas de la **familia PAT** regularían la agregación de los CLs. Tanto la depleción de Plin2/ADRP [332], como la sobreexpresión de Plin1 [360, 370] y CideC/Fsp27 [371] promueven la agregación de los CLs. Esta agregación podría llevar a fusión entre CLs en células que expresen CideC/Fsp27 [371]. Los CLs agregados en células que expresan Plin1

se dispersan por la fosforilación en respuesta a hormonas de la serina 492 de Plin1/perilipina por PKA [360, 372]. Estos resultados sugieren una relación entre el movimiento de los CLs y su metabolismo, relación anteriormente propuesta en nuestro grupo que observó que la sobreexpresión del dominante negativo de caveolina-3 CavDGV inhibía tanto el metabolismo como el movimiento de los CLs [93, 115].

La **dispersión de los CLs en respuesta a hormonas** se realizaría de forma progresiva, disgregándose en agregados cada vez más pequeños que finalmente dan CLs individuales [360, 372]. Dicha dispersión depende de microtúbulos, puesto que es sensible a nocodazol [360] y de proteínas motoras, dado que la depleción de dineína promueve la dispersión de los CLs [23]. Otro ejemplo de regulación del movimiento de CLs por hormonas es el que se da en células Y-1, procedentes de la corteza adrenal, donde la estimulación de la esteroidogénesis mediante la hormona ACTH promueve un incremento en el movimiento de los CLs, indicando una posible función de este proceso en la síntesis de hormonas [352].

Se ha propuesto que el movimiento de los CL podría tener como función la interacción con otros orgánulos, aunque también podría estar relacionado con su posible capacidad de almacén de lípidos y proteínas tóxicas que podrían reclutar desde diferentes zonas del citoplasma [349].

## 5.2 Interacción con otros orgánulos

Los CLs suelen mostrarse interaccionando con otros orgánulos como el **RE**, **mitocondrias**, **endosomas** o **peroxisomas** (Figura 9). Estos contactos pueden ser transitorios o estables, y se ha propuesto que tendrían un papel en el transporte de lípidos, aunque también podrían participar en el transporte de determinadas proteínas. El movimiento de los CLs (comentado en el apartado anterior) podría ser importante para estas interacciones [349].

Como ya hemos comentado, en los proteomas de los CLs frecuentemente se observan proteínas de otros orgánulos, consideradas contaminantes, indicando la frecuente interacción de los CLs con otros orgánulos. Además, el proteoma de CLs suele contener proteínas Rab, implicadas en el tráfico intracelular.

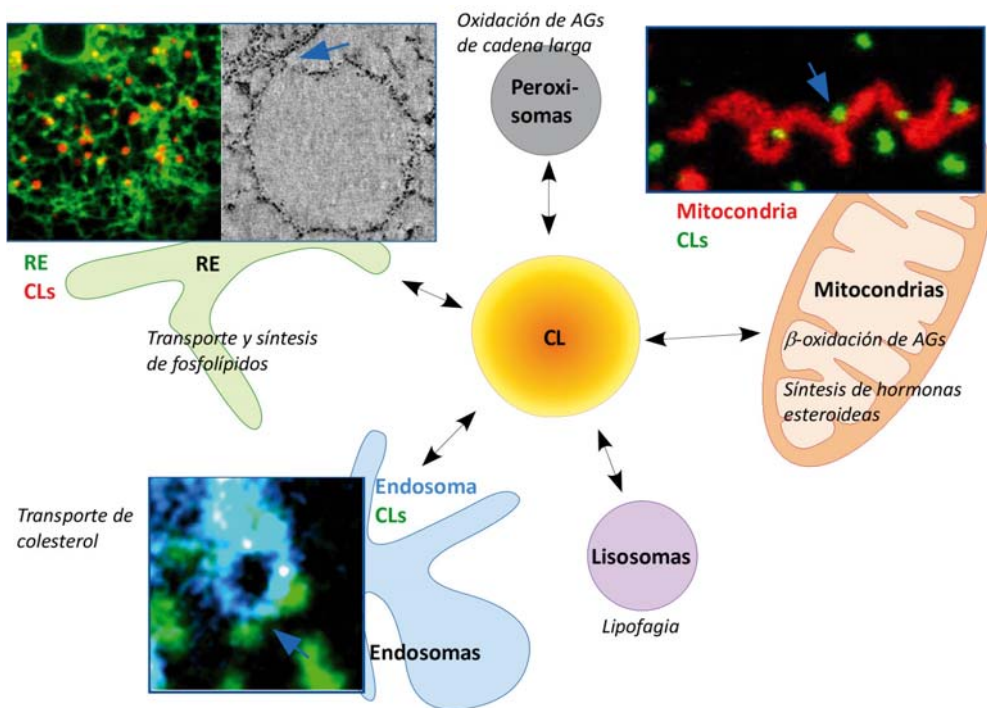


Figura 9. Interacción entre los CLs y otros orgánulos, y funciones propuestas de cada interacción.

### 5.2.1 Retículo endoplasmático

La interacción entre CLs y RE se ha observado frecuentemente mediante microscopía electrónica y de fluorescencia [373] (Figura 9), además, mediante proteómica se suelen detectar proteínas residentes en el RE en los CLs.

Como se ha explicado anteriormente, el modelo más aceptado de biogénesis indica que estos se formarían en los túbulos del RE, estando en contacto con este orgánulo en sus etapas iniciales. Además, parece que los CLs maduros mantendrían el contacto con el RE [351, 374-376]. Se ha demostrado el transporte bidireccional de proteínas entre los CLs y el RE de forma regulada según el estatus nutricional, reclutándose a los CLs durante su acumulación y retornando al RE en condiciones lipolíticas [209, 373, 374]. Este transporte, dado que se da de forma independiente de temperatura y energía, pondría de manifiesto la existencia de puentes membranosos entre ambos orgánulos o como mínimo una gran cercanía entre ellos [373, 374].

En la interacción entre CLs y RE se han implicado diferentes proteínas, siendo seipina y Rab18 las más relevantes.

La proteína **seipina** tiene la capacidad de formar oligómeros en forma de anillo [377] y se ha descrito en los lugares de contacto entre CL y RE, sugiriendo un papel de ésta en la comunicación entre ambos orgánulos. Además, la depleción de seipina provoca CLs gigantes [376, 378] y alteraciones morfológicas del RE que frecuentemente envuelve a los CLs [376]. Esta alteración morfológica provoca defectos en el movimiento de los CLs y en la lipólisis en levadura, indicando que posiblemente los CLs permanecen adheridos al RE y dicha interacción podría regular su metabolismo y el acceso de las lipasas a los CLs [375]. Además de seipina, también se ha propuesto la localización de un complejo formado por la DGAT2 y la acil-CoA sintetasa FATP1 en los lugares de contacto entre CLs y RE que promovería la acumulación de lípidos neutros y la formación de CLs de mayor tamaño [379].

En diferentes tipos celulares, la proteína **Rab18**, típica del RE [348], se localiza en los CLs [348, 380], especialmente en su forma unida a GTP (activa). En estos orgánulos la localización de Rab18 desplaza a proteínas como Plin2/ADRP, provocando una mayor interacción de los CLs con el RE [380]. En adipocitos, Rab18 se recluta a los CLs en respuesta a insulina y también a la estimulación  $\beta$ -adrenérgica [348, 381], condiciones en que los CLs y el RE parecen incrementar su interacción. En consonancia con la disminución de la Plin2/ADRP asociada a CLs, la sobreexpresión de Rab18 incrementa la lipólisis basal y la depleción de Rab18 la disminuye [381]. Además, Rab18 se localiza en CLs que no contienen Cav3DGV (que reduce el metabolismo y la movilización de los CLs), indicando que Rab18 se localizaría en los CLs activos lipolíticamente, mediando su interacción con el RE [93].

Se ha especulado que un posible papel de la interacción entre el RE y los CLs sería el transporte bidireccional de fosfolípidos, permitiendo eliminar los fosfolípidos sobrantes de los CLs cuando estos disminuyen de tamaño debido a la activación de la lipólisis, o reclutar rápidamente nuevos fosfolípidos cuando los CLs crecen de tamaño por la incorporación de lípidos neutros sintetizados *de novo*. Esta hipótesis sería coherente con las alteraciones tanto en la lipólisis como en la lipogénesis que provoca la modificación de la expresión de Rab18, y además con el tamaño aberrante de los CLs en ausencia de seipina, que podría deberse a la fusión entre CLs producto de una incorporación deficiente de fosfolípidos a los CLs.



## 5.2.2 Endosomas

Se ha descrito la interacción de CLs tanto con endosomas tempranos (*early endosomes*) como tardíos (*late endosomes*) en células en cultivo [348]. Más que una interacción estable, la interacción entre CLs y endosomas tempranos parece seguir una dinámica de *kiss-and-run*, con contactos transitorios entre los dos orgánulos. **Rab5**, proteína que media la interacción entre endosomas tempranos, también sería indispensable para la interacción de éstos con los CLs [382]. **Rab7**, proteína residente en endosomas tardíos, se ha detectado muy frecuentemente en los proteomas de CLs, aunque su localización en CLs no ha sido comprobada, pudiendo reflejar solamente la interacción de los CLs con esta clase de endosomas. La proteína **Rab11**, característica de endosomas de reciclaje también se ha detectado en CLs mediante inmunomicroscopía electrónica [382].

Se desconoce la función de esta interacción, aunque se ha especulado que podría servir para agilizar el transporte del colesterol internalizado desde las lipoproteínas endocitadas hacia los CLs.

## 5.2.3 Mitocondrias

Se ha propuesto que esta interacción serviría para el transporte de AGs o colesterol procedentes de la lipólisis de los CLs hacia las mitocondrias, donde se metabolizarían por  $\beta$ -oxidación [3, 15] o servirían para la síntesis de hormonas [389]. Dicho transporte ha sido analizado en adipocitos marrones [383] y células musculares [390], donde los CLs son la principal fuente de AGs oxidados en la mitocondria durante el ejercicio físico.

Los CLs se han visto en contacto con mitocondrias en adipocitos [383], en levadura [384], durante la maduración del polen de plantas del género *Magnolia* [385], en células esteroideogénicas [386], en óvulos (donde la  $\beta$ -oxidación de AGs es necesaria para el correcto desarrollo postfertilización) [387] o en fibroblastos en cultivo [352]. También se ha observado la interacción entre CLs y mitocondrias en células pulmonares de pacientes de sarcoidosis [388]. Aun así, el modelo donde más se ha observado la interacción entre estos orgánulos es el tejido muscular. Las mitocondrias y los CLs frecuentemente se encuentran interaccionando formando cadenas de orgánulos en el músculo esquelético [67, 391-395] y en el músculo cardíaco [396]. En el músculo esquelético dicha interacción incremen-

taría con el ejercicio físico [397], mientras que en el cardíaco lo haría en situación de ayuno [396]. En el músculo se ha observado que las mitocondrias oxidan preferentemente AGs procedentes de los CLs respecto a aquéllos que proceden directamente del exterior [398]. Además, durante el envejecimiento, aunque se acumulan más CLs, la interacción CL-mitocondria se reduce en este tejido [399].

En células hepáticas, el resveratrol, activador de la deacetilasa SIRT1, incrementa la interacción entre CLs y mitocondrias [400], y se ha propuesto que incrementando el consumo de los AGs de los CLs vía mitocondrial, esta droga revertiría los efectos del envejecimiento en el metabolismo hepático.

El mecanismo molecular que media la interacción entre CLs y mitocondrias es bastante desconocido, aunque recientemente se ha implicado a la proteína **Plin5/OXPAT** en este proceso. Aunque también se encuentra en mitocondrias [392, 396], Plin5/OXPAT se localiza mayoritariamente en los CLs [396, 401], donde regula las lipasas ATGL [402-404] y HSL [77] y consecuentemente la lipólisis. Plin5/OXPAT modularía la lipólisis de forma similar a Plin1/Perilipina en adipocitos, inhibiendo la lipólisis basal y promoviendo en respuesta a estimulación  $\beta$ -adrenérgica [403, 404].

La expresión de Plin5/OXPAT en músculo incrementa durante el ayuno [396, 401] y en atletas entrenados respecto a individuos sedentarios [405], correlacionando con la interacción entre CLs y mitocondrias. La sobreexpresión de Plin5/OXPAT, y no de Plin2/ADRP, incrementa la interacción entre CLs y mitocondrias [396], además de la oxidación de AP exógeno (no incorporado en los CLs) [401], y que dicho incremento sólo se observa en presencia de CLs y no en mitocondrias aisladas [392], por lo que los AGs deberían pasar por el CL para que Plin5/OXPAT incremente su oxidación.

Así, esta proteína coordinaría la interacción entre CLs y mitocondrias con la lipólisis en tejidos altamente oxidativos, agilizando el paso de AGs de los CLs a las mitocondrias en estos tejidos para evitar posibles efectos lipotóxicos de los AGs. Cabe tener en cuenta que Plin5/OXPAT solamente se expresa en tejidos muy oxidativos como músculo, hígado y tejido adiposo marrón [401], mientras que la interacción entre CLs y mitocondrias se observa también en otras clases de tejidos. Así, deben existir mecanismos adicionales, conservados en los diferentes tejidos para mediar la interacción entre CLs y mitocondrias, a los que, en tejidos con elevada función oxidativa, se añadiría la estabilización de dicha interacción mediada por Plin5/OXPAT.

En este sentido, en ensayos *in vitro*, se ha observado que la interacción entre CLs y mitocondrias incrementa al añadir un GTP no hidrolizable, de manera que dependería de proteínas Rab [393]; además, la proteína SNARE SNAP23 también podría estar implicada en ello [394]. Finalmente, también se ha propuesto que la proteína mitocondrial Opa1 (implicada en la dinámica mitocondrial), que ejerce de anclaje de la PKA cuando se localiza en CLs [406], podría estar implicada en la coordinación de la interacción entre CLs y mitocondrias para facilitar el paso de AGs procedentes de la lipólisis para la producción de ATP en la mitocondria [406].

### **5.2.4 Peroxisomas**

Los peroxisomas son orgánulos ubicuos implicados en múltiples procesos metabólicos como la biosíntesis de fosfolípidos y sales biliares, o el catabolismo de AGs de cadena muy larga, prostaglandinas y leucotrienos. La interacción entre CLs y peroxisomas ha sido demostrada en levadura, donde permite acoplar la lipólisis de los TAG de los CLs a la oxidación de AGs en los peroxisomas. En este trabajo se describen extensiones de los peroxisomas que entran en los CLs en un proceso que requiere de la hemifusión de la membrana del peroxisoma con la monocapa de fosfolípidos del CL [407]. La asociación entre CLs y peroxisomas también se ha observado en células COS-7 [408] y adipocitos [409].

Además, se ha propuesto que la interacción entre peroxisomas y CLs estaría implicada en la síntesis de los monoalquil(en)il-diacilgliceroles que forman parte de los CLs en determinados tejidos [20].

### **5.2.5 Lisosomas, fagosomas y autofagosomas**

También se ha observado la interacción entre CLs y autofagosomas o lisosomas, que podría reflejar la metabolización de los CLs en estos orgánulos por autofagia descrita recientemente [410] y que será explicada más adelante.

La interacción transitoria entre CLs y fagosomas se ha descrito en leucocitos, donde se postula que podría tener un papel en el aporte de ácido araquidónico hacia los fagosomas [411].

# METABOLISMO DE LOS CUERPOS LIPÍDICOS

A lo largo del tiempo el aporte de sustratos energéticos fluctúa entre periodos de abundancia y escasez, por lo que la habilidad de almacenar energía en situación de abundancia y movilizarla en situación de escasez ha aportado una ventaja competitiva a lo largo de la evolución. El principal almacén de energía de las células consiste en empaquetarla en forma de TAG en los CLs [37, 200]. Otras formas en que las células almacenan energía son los polisacáridos como el glucógeno o el almidón. Los átomos de carbono en los AGs están más reducidos que en los glúcidos por lo que la oxidación de los TAG proporciona más del doble de energía, gramo por gramo, que los glúcidos. Debido a su hidrofobicidad, los TAG son una forma de almacenar energía más compacta y eficiente que los polisacáridos, que se hidratan con el doble de su peso en agua [412]. Por ejemplo, una persona de peso medio (no obesa) almacena alrededor de 2.500 KJ en forma de glucógeno mientras que su tejido adiposo contiene más de 500.000 KJ en forma de TAG, suficiente para correr 30 maratones [8]. Además de su función energética, los CLs también proporcionan lípidos para la síntesis de membranas y otros componentes celulares, por lo que el control de la metabolización de los CLs es clave para garantizar el aporte de AGs para todas estas funciones.

Dada la gran importancia de la metabolización de los CLs, las células han desarrollado diferentes mecanismos para consumir los CLs y obtener AGs a partir de éstos: la **lipólisis citosólica**, especialmente relevante en el tejido adiposo, la **lipólisis en el retículo endoplasmático**, importante para la síntesis de lipoproteínas o la secreción de colesterol, y el consumo de CLs por autofagia o **lipofagia**. En este apartado abordamos estos mecanismos, así como el destino metabólico de los AGs obtenidos del metabolismo de los CLs.

## 6.1 Lipólisis citosólica

La lipólisis consiste en la hidrólisis de los TAG hasta generar AGs libres y glicerol. Se han descubierto 3 enzimas que promueven la lipólisis citosólica, **ATGL/PNPLA2** (*adipose triglyceride lipase*), **HSL** (*hormone-sensitive lipase*) y **MGL** (*monoglyceride lipase*). ATGL promueve el paso limitante de la vía, catalizando la conversión de TAG a DAG y liberando un AG [413, 414]. HSL es capaz de hidrolizar

TAG, DAG o MAG, aunque tiene mucha más afinidad por el DAG, degradándolo para generar MAG y un AG libre [415]. Por su parte, MGL promueve la conversión del MAG en glicerol y un AG [415].

### 6.1.1 Mecanismo general

La modulación de la lipólisis depende básicamente de la regulación de la actividad de ATGL y HSL (ver Figura 11, panel superior).

**ATGL** se localiza en CLs [413, 416] y, además de su actividad lipasa de TAG, tendría actividad transacilasa convirtiendo dos DAG en un TAG y un MAG [414]. La depleción de ATGL en ratones provoca la acumulación de CLs en prácticamente todos los tejidos, especialmente en aquéllos más oxidativos [415]. Además, su depleción o su sobreexpresión, reducen o incrementan respectivamente, el tamaño de los CLs en células en cultivo [416].

El cofactor **CGI-58/Abhd5**, cuando está unido a CLs, interacciona con ATGL e incrementa su actividad [415, 417-419], en consonancia con este efecto, su depleción reduce la lipólisis [420] y provoca acumulación de TAG en diferentes tejidos. Aun así, la regulación de ATGL es mucho más compleja y requiere de la intervención de múltiples proteínas. Recientemente se ha descrito que el complejo formado por las proteínas UBXD8 y p97/VCP se une a ATGL e impide su unión a CGI-58/Abhd5, y por lo tanto su activación [421]. Además, G0S2, interacciona con ATGL, independientemente de su unión a CGI-58/Abhd5, inhibiendo su actividad lipasa [422, 423] y la reducción de su expresión en el hígado provoca esteatosis [424]. ATGL también podría regularse mediante fosforilación por parte de AMPK, aunque el efecto de dicha fosforilación es controvertido [425, 426].

**HSL** también realiza su actividad localizándose en los CLs. Curiosamente los ratones deficientes en HSL no muestran una acumulación de CLs tan obvia como los deficientes en ATGL, y tan solo se observa un moderado decrecimiento de la lipólisis inducida por hormonas. Estos ratones acumulan DAG, indicando el importante papel de HSL en la degradación de esta molécula [427].

Aunque es fosforilada por diferentes quinasas, la modulación de la actividad lipolítica de HSL se realiza mayoritariamente mediante la regulación de su localización en los CLs, que depende de las proteínas PAT expresadas en cada tejido [428]. Aun así, también se ha descrito que la interacción con FABP4 incrementa

la actividad de HSL *in vitro* [429].

**MGL** se encuentra en el citoplasma, en la membrana plasmática y en los CLs [430]. Al contrario de ATGL y HSL, no se han descrito mecanismos de regulación para ésta. Los ratones deficientes en MGL muestran una menor lipólisis en el tejido adiposo en respuesta a  $\beta$ -adrenérgicos, y una acumulación de MAG en el hígado [430].

Se han identificado **otras lipasas** diferentes aunque han sido hasta el momento menos estudiadas. Muchas de ellas como PNPLA1, PNPLA3/Adiponutrina, PNPLA4/GS2 o PNPLA5 pertenecen a la familia PNPLA, homologas a ATGL. Se ha postulado que PNPLA3/Adiponutrina, con demostrada actividad lipasa de TAG y transacilasa, podría tener un papel en la lipólisis en el hígado [431], aunque el ratón deficiente en esta proteína no muestra una alteración del metabolismo lipídico [432].

Las **proteínas PAT** regulan la lipólisis inhibiéndola o activándola según la clase de proteína y la situación metabólica. Plin2/ADRP y Plin3/TIP47 se expresan de forma ubicua y forman una barrera en los CLs que, por un lado, impide la fusión entre CLs y, por otro lado, reduce la lipólisis basal, disminuyendo la incorporación de ATGL a los CLs [91, 98]. La capacidad de Plin2/ADRP de inhibir la lipólisis basal es menor a la de Plin1/Perilipina [3]. La estimulación de PKA reduce la interacción de Plin2/ADRP con ATGL y HSL [77, 433].

A continuación se comenta el mecanismo de lipólisis basal en adipocitos y tejidos oxidativos, regulado principalmente por Plin1/Perilipina y Plin5/OXPAT respectivamente.

### 6.1.2 Lipólisis en adipocitos

En tejidos con gran acumulación de lípidos como el tejido adiposo la regulación de estas lipasas viene determinada por la expresión de **Plin1/Perilipina**. En tejido adiposo el 90% de actividad lipasa corresponde a ATGL y HSL [413, 434]. (ver Figura 11, panel central).

### ***Lipólisis basal***

Plin1/Perilipina interacciona en condiciones basales con ATGL [249] y CGI-58/Abhd5 [435, 436] inhibiendo la actividad lipasa y por lo tanto la lipólisis basal. Así, en ratones deficientes en Plin1/Perilipina, la lipólisis basal se ve incrementada [437]. Estos resultados apuntan a un papel más relevante para ATGL respecto a HSL en la lipólisis basal en adipocitos [438]. La actividad basal de ATGL también está controlada por la expresión de G0S2 [423].

### ***Lipólisis estimulada por $\beta$ -adrenérgicos***

Plin1/perilipina tiene un papel clave en la lipólisis estimulada por hormonas en tejidos con gran acumulación de lípidos, en consecuencia, los adipocitos procedentes de animales deficientes en Plin1/Perilipina, no son capaces de estimular la lipólisis en respuesta a  $\beta$ -adrenérgicos [437].

La lipólisis citosólica se activa en respuesta a adrenalina, liberada a la sangre en situaciones como el ayuno o durante el ejercicio y afecta especialmente a los adipocitos, dado que son el mayor reservorio de CLs del cuerpo. La estimulación  $\beta$ -adrenérgica activa la lipólisis mediante diferentes vías como las MAPK y Src [439-442]. Aun así, la principal implicada en esta regulación es la quinasa PKA. **PKA fosforila Plin1/Perilipina** [66, 443] en la serina 517 promoviendo el reclutamiento de HSL a los CLs [437, 443, 444], aunque también se ha postulado su reclutamiento de forma independiente de la fosforilación de Plin1/Perilipina por PKA [445]. La fosforilación de Plin1/Perilipina también promueve la asociación de ATGL a los CLs [249] e inhibe la interacción de Plin1/Perilipina con CGI-58/Abhd5 permitiendo a ésta activar ATGL [443, 446]. En la superficie de los CLs, Plin1/Perilipina interacciona con RIP140 y esta interacción permite un mejor reclutamiento de HSL y la disociación de CGI-58/Abhd5 de la Plin1/Perilipina [447] activando ATGL.

Además, **PKA también fosforila HSL** activándola [66, 77]. Caveolina-1 sería necesaria para la fosforilación de Plin1/Perilipina y de HSL por PKA, formando un complejo con Plin1/Perilipina y PKA en respuesta a  $\beta$ -adrenérgicos [131, 133].

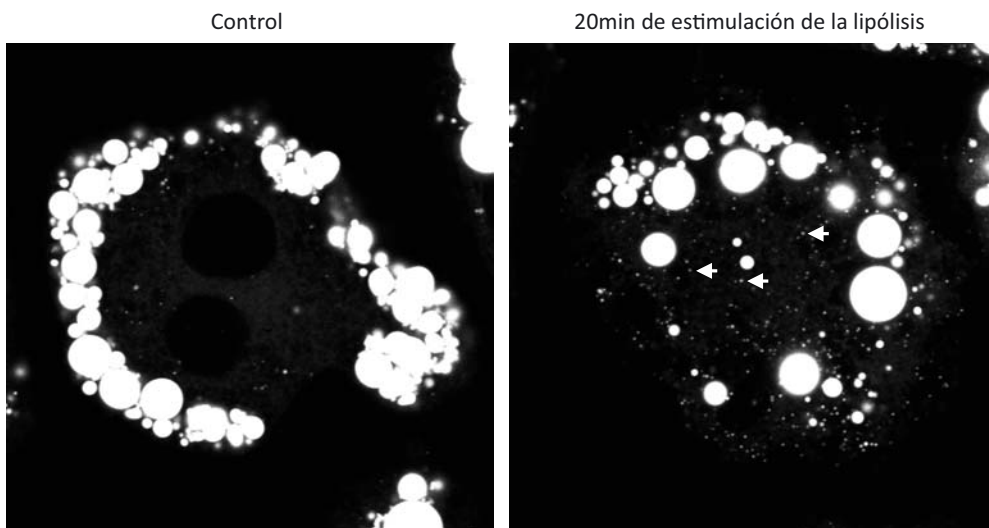
Aunque inicialmente se describió D-AKAP1 como la proteína de unión a PKA mayoritaria en adipocitos [448], recientemente se ha descrito que la proteína

Opa-1, (relacionada con la fusión mitocondrial), se encuentra en los CLs de estas células donde forma un complejo con PKA y Plin1/perilipina que permite la fosforilación de esta última [406]. Cabe destacar que Opa-1 no afecta al estado de fosforilación de HSL, apuntando a un papel de otras proteínas de unión a PKA (AKAP) como D-AKAP1 o caveolina-1 en esta función.

### ***Re-esterificación de AGs post-lipólisis***

Inicialmente se describió que la estimulación de la lipólisis mediante  $\beta$ -adrenérgicos promueve la fragmentación de los CLs de adipocitos a través de la fosforilación de la Plin1/Perilipina en el residuo 492 [372]. El reclutamiento de Plin1/Perilipina y de las lipasas, tanto HSL como ATGL durante la estimulación de la lipólisis se daría preferentemente en los CLs de menor tamaño [449, 450], así la fragmentación de los CLs de adipocitos promovería la lipólisis. Recientemente se ha visto que en lugar de fragmentación, los grandes CLs de los adipocitos son completamente metabolizados y en su lugar se observa la formación de micro-CLs mediante la re-esterificación en el RE de los AGs obtenidos por la lipólisis [245, 248, 451] (ver flechas en Figura 10). Del mismo modo que los CLs considerados inicialmente como fragmentados, también se ha sugerido un reclutamiento de la maquinaria lipolítica en estos microCLs [451].

#### Adipocitos



**Figura 10. Síntesis *de novo* de CLs en 3T3L1 adipocitos al estimular la lipólisis.**



El mayor reclutamiento de ATGL a los CLs, mediante su sobreexpresión o la depleción de la proteína  $\gamma$ -sinucleína, promueve la formación de un mayor número de CLs y de menor tamaño [262, 452], estos resultados concordarían con un incremento en el ciclo de lipólisis y re-esterificación. La mayor actividad lipasa impediría la acumulación de grandes CLs estimulando la formación de nuevos CLs.

Al terminar la estimulación  $\beta$ -adrenérgica, los microCLs post-lipolíticos, acumulan progresivamente lípidos hasta llegar a formar nuevamente grandes CLs; este proceso de maduración vendría mediado por insulina [245, 248]. La interacción de Plin1/Perilipina con CideC/Fsp27 es importante para este proceso [249, 453] y la fosforilación de la primera en el residuo 492 podría interferir en dicha interacción evitando la maduración de los CLs y acumulándose CLs de menor tamaño procedentes del ciclo de lipólisis y re-esterificación, incrementado por la estimulación  $\beta$ -adrenérgica.

### ***Efecto de la insulina en la lipólisis***

La insulina promueve el efecto contrario al de la estimulación mediante  $\beta$ -adrenérgicos, desactiva la lipólisis mediante la disminución de la expresión de ATGL y HSL e inhibe la activación de PKA [432]. Para ese efecto se han descrito diferentes vías. La vía canónica postula que la insulina activa Akt/PKB y a su vez la fosfodiesterasa PDE3b que degrada el AMP cíclico reduciendo la activación de PKA [454]. Aun así, también se ha descrito que la insulina inhibe la fosforilación específicamente de Plin1/Perilipina y no de otros sustratos de PKA como HSL en una vía independiente de Akt/PKB [455]. Dicha especificidad correlaciona con la especificidad de la proteína de unión a PKA Opa-1 para la fosforilación de Plin1/perilipina y no de HSL por lo que esta vía de respuesta a insulina podría afectar a diferentes proteínas de anclaje de PKA a los CLs.

## **6.1.3 Lipólisis en tejidos oxidativos**

Además de Plin2/ADRP, los tejidos oxidativos expresan **Plin5/OXPAT**, que incrementa aún más durante el ayuno [456]. En estos tejidos, tanto HSL como ATGL participan en la lipólisis, siendo por ejemplo responsables del 98% de la actividad lipasa en músculo esquelético [457] (ver Figura 11, panel inferior).

La sobreexpresión de Plin5/OXPAT reduce la lipólisis basal [396, 458, 459] e

incrementa la acumulación de CLs [460]. Además, en consonancia con su función como barrera lipolítica, los ratones deficientes en Plin5/OXPAT muestran una acumulación de CLs en el corazón muy reducida, fenotipo reversible con la inhibición de las lipasas [461].

Plin5/OXPAT en condiciones basales tiene la capacidad de reclutar HSL a los CLs, y posteriormente, la actividad lipolítica de HSL es estimulada en respuesta a hormonas por la fosforilación de PKA [77]. La activación de AMPK en células musculares parece reducir la activación de HSL por parte de la PKA [462].

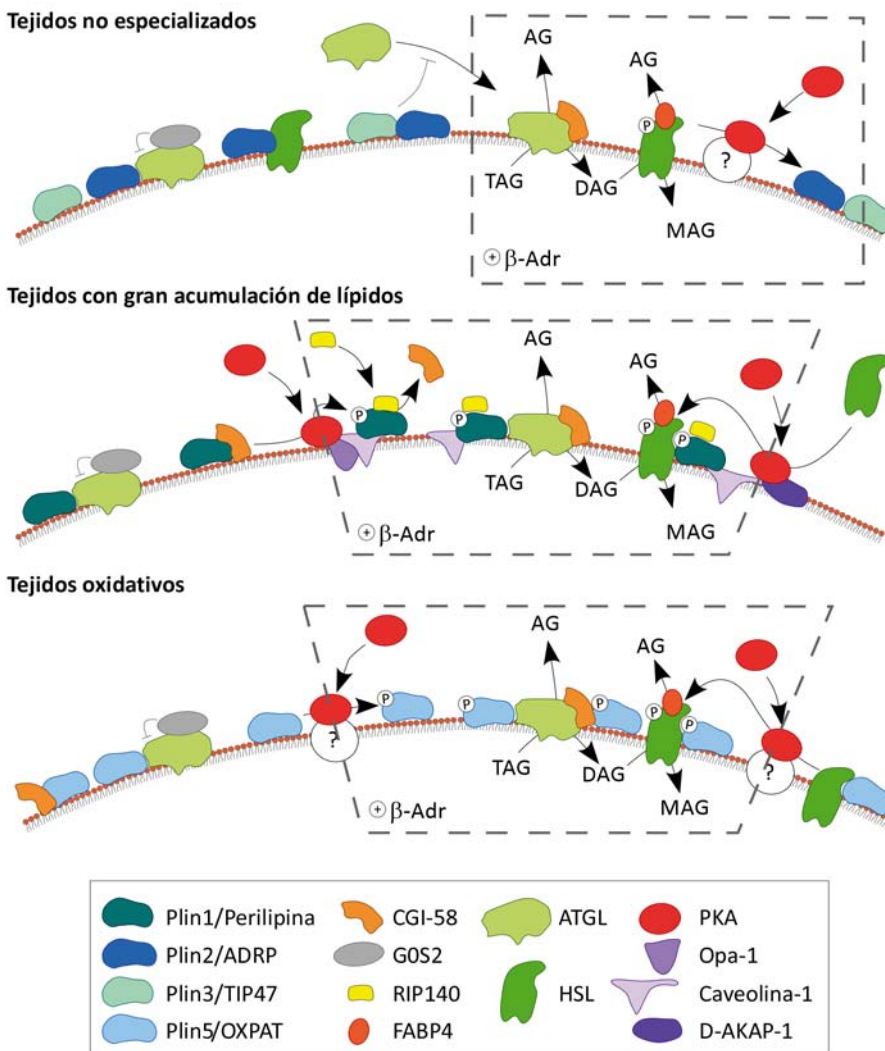


Figura 11. Regulación de la lipólisis citosólica en diferentes tejidos.

Plin5/OXPAT también interacciona con ATGL [403, 459] y su coactivador CGI-58/Abhd5 [463] en la superficie de los CLs, aunque nunca interacciona con ambas a la vez [403]. Durante la estimulación de la lipólisis mediante activación de PKA, Plin5/OXPAT se fosforila y se ha propuesto que dicha fosforilación permitiría la interacción entre ATGL y CGI-58/Abhd5 [404].

## 6.2 Lipólisis en el retículo endoplasmático

Se ha descrito que los CLs pueden metabolizarse por lipasas residentes en el RE. El mecanismo molecular de dicha lipólisis es bastante desconocida aunque se han descrito diferentes lipasas implicadas en este proceso. Esta clase de lipólisis parece relevante en la secreción de lipoproteínas o la secreción de colesterol en macrófagos.

### 6.2.1 Secreción de lipoproteínas

La lipólisis en el retículo endoplasmático es especialmente relevante en los tejidos que sintetizan lipoproteínas como el hígado, donde, en ratones en ayunas, tan solo el 50% de la actividad lipasa de TAG es atribuible a ATGL. Tanto los ratones deficientes en HSL como los ratones deficientes en ATGL en el hígado tienen una secreción de VLDL normal [430, 464], aunque estos últimos acumulan más CLs. Por lo tanto, la movilización de TAG necesaria para la síntesis de lipoproteínas en el hígado tiene que estar regulada por otras lipasas [3, 430, 432].

Se ha descrito que en la secreción de lipoproteínas participarían la lipasa **Ces3/TGH-1** [430, 465, 466] (con el TAG como sustrato preferente [467]) y la arilacetamida deacetilasa (**AADA**) (con el DAG como sustrato preferente [430]).

Ces3/TGH-1 se localiza en regiones del RE en contacto con los CLs y su deficiencia en hepatocitos provoca defectos en la fusión y transferencia de lípidos entre CLs. El mecanismo por el que actúa esta lipasa es aún desconocido, tanto Ces3/TGH-1 como su homóloga CesML1/TGH-2 se localizan en el RE, aunque se cree que con el sitio catalítico encarado hacia el lumen, por lo que podrían ser más importantes en la hidrólisis del TAG microsomal que de los TAG presentes en los CLs citosólicos [415]. Ces3/TGH-1, y también su homóloga **CesML1/TGH-2**,

podrían tener un papel en la regulación de la lipólisis en adipocitos, puesto que su depleción reduce la lipólisis basal y estimulada por  $\beta$ -adrenérgicos respectivamente [468].

Al contrario de Ces3/TGH-1, su homóloga **Ces1/Es-x**, también localizada en el RE, disminuiría el direccionamiento de los AGs hacia la secreción de lipoproteínas. Expresándose en menor medida en el hígado e intestino en aquellas situaciones donde estos tejidos secretan lipoproteínas (VLDL y quilomicrones respectivamente) [430].

## 6.2.2 Secreción de colesterol en macrófagos

Otro proceso en que están implicadas las lipasas del RE es la secreción de colesterol en macrófagos. Los macrófagos principalmente acumulan CE en los CLs a partir de la captación de lipoproteínas de baja densidad (LDL). En lesiones ateroscleróticas, los macrófagos cargados de lípidos (*foam cells*) requieren de la hidrólisis de los CE de los CLs para realizar el **transporte reverso de colesterol** hacia el hígado que a su vez secreta colesterol como sales biliares, mecanismo necesario para la protección frente la aterosclerosis [469].

Las enzimas encargadas de degradar los CE son las hidrolasas neutras de ésteres de colesterol. Aunque tanto HSL como Ces3/TGH-1 tienen la capacidad de metabolizar CE, la lipólisis asociada a la secreción de colesterol en *foam cells* dependería de la hidrolasa neutra de ésteres de colesterol-1 (**NCEH1**) [468], localizada en el RE. Los ratones deficientes en esta proteína son más susceptibles a aterosclerosis, tienen mayor acumulación de CE en macrófagos y menor actividad hidrolasa de CE. Además, su sobreexpresión en macrófagos reduce los niveles de CE [37, 468]. Se ha descrito que esta enzima se localiza en los CLs en respuesta a la acumulación de lípidos en estas células [81], aunque dicha localización también podría corresponder al RE adyacente a éstos [236].

Además de su metabolización por parte de las lipasas neutras, los CE de macrófagos también se pueden metabolizar por la **lipasa ácida lisosomal**, por lipofagia, descrita en el siguiente capítulo, que también participa en el transporte reverso de colesterol [469].

## 6.3 Autofagia de CLs o Lipofagia

La macroautofagia es una vía de degradación de orgánulos dañados y agregados citosólicos de proteínas mal plegadas que son englobados por una membrana en el citosol, formada a partir de MAM [470], que acabará formando un autofagosoma que posteriormente será fusionado con lisosomas para proceder a la degradación de su contenido. Estos orgánulos degradan TAG y CE mediante la **lipasa ácida lisosomal** (LAL) de la misma manera que las lipoproteínas internalizadas por los endosomas [432].

Recientemente se ha descrito el papel de la autofagia en la metabolización de los CLs [410]. En este trabajo, Singh y colaboradores, describen por primera vez la incorporación total o parcial de CLs en el interior autofagosomas y desde allí a lisosomas donde la LAL degradaría los lípidos que contienen, en un mecanismo que llamaron lipofagia [410]. La inhibición de la autofagia o de la función lisosomal en hepatocitos promueve una mayor acumulación de CLs en respuesta a AO y una menor  $\beta$ -oxidación de AGs procedentes del exterior. También provoca la menor secreción de lipoproteínas en hígado de ratón [410].

En situación basal, la lipofagia sería proporcional a la activación de la autofagia y a los lípidos acumulados por la célula, por lo que parte del consumo de lípidos por autofagia correspondería a una **lipofagia no selectiva** o basal [410]. Sin embargo, además de la lipofagia basal, también parece existir una **lipofagia más selectiva** inducida por la ausencia de suero. Además, en situación de **ayuno**, el hígado acumula CLs y la lipofagia incrementa [410], hecho que también se da en músculo cardíaco [471]. Además, también se ha descrito en *C. elegans* un mecanismo por el cual se coordina la disponibilidad de nutrientes con la expresión de la LAL, encargada de degradar lípidos en los lisosomas, de manera que en situación de depleción de nutrientes se estimula la lipofagia [474]. También se ha observado una mayor degradación por autofagia de CLs y mitocondrias durante la **esteatosis alcohólica** [472]. Este mecanismo de consumo de CLs por lipofagia se ve disminuido en situación de **obesidad** [410] y se ha postulado que el decrecimiento de la autofagia durante el envejecimiento promovería la mayor acumulación de CLs observada [410].

La señalización que promueve la lipofagia es poco conocida. Recientemente se ha descrito que en células endoteliales, dependería de la activación de la AMPK por parte de la CAMKK $\beta$  en respuesta a un aumento de calcio [473].

La lipofagia tiene un papel importante en la metabolización de los CLs para su **secreción en macrófagos** en situación de aterosclerosis [51, 475, 476], así como en la metabolización de los CLs que contienen **ácido retinoico** de las células estrelladas del hígado, durante su activación frente al daño hepático [318, 477]. Además, el consumo de los CLs mediante lipofagia en las neuronas del hipotálamo regula la **ingestión de comida** y la sensación de hambre en situación de ayuno [478]. Finalmente, algunos tipos de **cáncer**, como el cáncer de próstata [479], o la infección por virus como el Dengue, también activan el consumo de CLs por autofagia.

Además de su función en la metabolización de los CLs en diferentes tejidos, se ha postulado un rol de la autofagia en la **diferenciación de los adipocitos**. La autofagia se activa durante este proceso [268] y la disminución de la expresión de Atg7 o Atg5 (implicadas en la formación y maduración de autofagosomas) causan defectos en la diferenciación a adipocitos [268, 480]. La depleción de LC3 también causa la reducción de la acumulación de CLs durante el proceso de diferenciación en adipocitos de células 3T3L1 [267].

El papel de la autofagia en la acumulación de CLs no es exclusivo del tejido adiposo, puesto que los ratones con Atg7 silenciada específicamente en el hígado tienen una acumulación mucho menor de CLs en situación de ayuno [471]. Además, la depleción de LC3 reduce la formación de CLs y la cantidad de TAG en situación basal en diferentes tipos celulares en cultivo [267].

## 6.4 Destino metabólico de los ácidos grasos

Los AGs obtenidos del metabolismo de los CLs tienen diferentes destinos, pudiendo ser **re-esterificados** en forma de TAG para su almacén,  **$\beta$ -oxidados** para generar energía o cuerpos cetónicos, usados para la **síntesis de fosfolípidos**, **exportados** o servir como **ligandos de factores de transcripción** [8] (Figura 12).

Se ha observado el uso preferencial de los AGs de los CLs en algunos procesos respecto a los AGs procedentes directamente del exterior. Algunos ejemplos son la síntesis de fosfolípidos, señalización, producción de VLDLs, la promoción de la fagocitosis en macrófagos e incluso la síntesis de arilceramidas en queratinocitos [481]. Estas diferencias en el direccionamiento de los AGs a una función u otra según su origen podrían depender de las diferentes ACSLs.

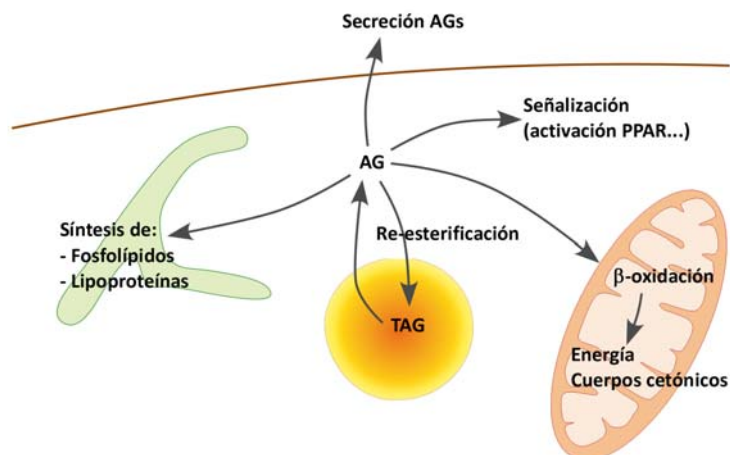


Figura 12. Posibles destinos metabólicos de los AGs de los CLs.

### 6.4.1 Re-esterificación en CLs

La mayoría de células están continuamente realizando lipólisis de los TAG y re-esterificación de los AGs obtenidos. El ciclo de lipólisis y re-esterificación (recambio de CLs) más elevado se encuentra en el miocardio, donde se llega a recambiar aproximadamente todo el conjunto de CLs en 1h, mientras que los hepatocitos en el mismo tiempo recambiarían el 4% del pool de TAG y los adipocitos el 0,4% [481].

En **adipocitos**, la mayoría de AGs procedentes de la lipólisis son re-esterificados a TAG [8, 482]. La función exacta de este ciclo fútil de continua lipólisis y re-esterificación de AGs es desconocida, aunque podría servir para poder modular finamente el aporte de lípidos a la sangre y sucedería tanto durante la lipólisis basal como durante la lipólisis estimulada por hormonas, aunque en menor proporción en esta última, aumentando la proporción de AG liberados al exterior [8, 449]. La lipólisis dedicada al recambio de CLs no sería completa hasta glicerol en adipocitos, puesto que al inhibir la re-esterificación se incrementa la secreción de AGs pero no de glicerol [166].

La re-esterificación de los AGs requiere de la activación del AG a acil-CoA por parte de una ACSL, en una reacción que genera AMP. La isoforma más relevante en este proceso en el tejido adiposo es **ACSL1** [166]. Durante la lipólisis en adipocitos se produce un pico de AMP, atribuido a la activación de AGs, que activa **AMPK** promoviendo la β-oxidación de AGs, por un lado para obtener energía para poder seguir re-esterificando AGs y, por otro lado, para reducir la

concentración citosólica de AGs con el objetivo de evitar la lipotoxicidad [483]. La AMPK, una vez activa también reduce la lipólisis [488] mediante la inhibición de la fosforilación de HSL por PKA [484, 485]. Por lo tanto la AMPK actuaría como un mecanismo de control de la lipólisis, y facilitaría la re-esterificación de los AGs. La activación de la **PKA** en respuesta a  $\beta$ -adrenérgicos promueve la inhibición de la AMPK, reduciendo la proporción de AGs  $\beta$ -oxidados o re-esterificados y aumentando la cantidad de AGs exportados a la sangre [486], aunque finalmente AMPK se acaba activando [485], permitiendo la re-esterificación de AGs y preservando la función de los adipocitos. Así, el equilibrio entre la activación de PKA y AMPK regularía la coordinación de la respuesta lipolítica aguda a  $\beta$ -adrenérgicos.

Se ha propuesto que este ciclo de re-esterificación de los AGs sería el responsable de la **transformación de tejido adiposo blanco en marrón** provocada por la exposición al frío, que promovería la generación de calor mediante la oxidación de AGs en la mitocondria. En este contexto las células pasan de tener un gran CL unilocular a CLs multiloculares incrementando la superficie disponible para la lipólisis [487].

Además de regular la secreción de AGs en adipocitos blancos y el uso de AGs en la mitocondria en adipocitos marrones, el ciclo de lipólisis y re-esterificación de AGs también modula la **secreción de lipoproteínas** en el **hígado e intestino** [481]. Finalmente, en los **macrófagos** se ha descrito que el colesterol esterificado está continuamente hidrolizándose y re-esterificándose facilitando su secreción de forma paulatina [51].

### 6.4.2 $\beta$ -oxidación mitocondrial

Otro destino de los AGs de los CLs es la  $\beta$ -oxidación mitocondrial. La sobreexpresión de lipasas citosólicas en células hepáticas promueve un incremento de la  $\beta$ -oxidación y la secreción de AGs, reduciendo la acumulación de CLs [430, 488]. Consecuentemente, los ratones deficientes en ATGL en el hígado, muestran una  $\beta$ -oxidación reducida [430]. Aun así, el aporte de AGs procedentes de los CLs para la  $\beta$ -oxidación mitocondrial en el hígado es controvertido, dado que parece que la mayoría de AGs  $\beta$ -oxidados en el hígado adulto son de origen externo, al menos aquéllos destinados a la síntesis de cuerpos cetónicos [481].

Por el contrario, los CLs sí suministran los AGs necesarios para la obtención



de energía mediante  $\beta$ -oxidación en el **miocardio**, por lo que el uso preferente de los AGs de los CLs para la  $\beta$ -oxidación dependería del tejido. Estudios en células pancreáticas también sugieren un requerimiento del ensamblaje de los AGs en CLs para la posterior  $\beta$ -oxidación [489]. También se ha postulado un papel energético de los AGs de los CLs en **macrófagos**, donde la energía obtenida sería necesaria para la fagocitosis [490].

### 6.4.3 Síntesis de fosfolípidos

Los CLs también sirven como fuente de substrato para la síntesis de fosfolípidos [491]. Dicho proceso, además, es insensible a la inhibición de las ACSL mediante triacsina C, indicando que mayoritariamente el DAG obtenido de la lipólisis es usado para la síntesis de fosfolípidos y no así los AGs libres obtenidos [491].

En levadura, la delección de las lipasas causa un retraso en la entrada en ciclo celular por falta de síntesis de membranas [492]. Además, en *Drosophila melanogaster*, la pérdida de la lipasa Brummer, homóloga de ATGL, causa letalidad embrionaria. Estos resultados apuntan a la posibilidad que los AGs específicamente derivados de la lipólisis de los CLs serían usados para la síntesis de fosfolípidos de forma más eficiente que aquellos captados directamente del exterior [14].

### 6.4.4 Secreción como AGs libres o lipoproteínas

Como se ha comentado anteriormente, los CLs de adipocitos, proporcionan AGs para su secreción en sangre en respuesta a  $\beta$ -adrenérgicos.

En el caso del hígado, se ha descrito que, mayoritariamente, los AGs que son usados para la síntesis de lipoproteínas proceden de los CLs. Incluso en momentos de aporte de AGs de la sangre, éstos primero serían esterificados en los CLs y posteriormente usados para la síntesis de VLDL [481]. En el caso del corazón, donde la síntesis de lipoproteínas serviría para eliminar el exceso de AGs acumulados para evitar la lipotoxicidad, también se ha propuesto que los CLs servirían de substrato para la síntesis de lipoproteínas [481].

Para ser usados en la síntesis de lipoproteínas, los TAG de los CLs deben ser metabolizados a AGs y luego re-esterificados en el RE para posteriormente incorporarse en lipoproteínas [481]. El mecanismo de transferencia de lípidos desde los CLs a las lipoproteínas es bastante desconocido. Parece que la proteína transportadora de TAG microsomal (**MTP**), expresada en los tejidos que sintetizan lipoproteínas, transportaría los lípidos procedentes de CLs citosólicos hacia el interior del RE donde se formarían CLs intraluminales. Éstos se fusionarían con precursores de lipoproteínas que ya contienen apolipoproteínas como **ApoB** generando lipoproteínas. Otra posibilidad sería que lipasas del RE (descritas anteriormente), que se han encontrado también en los CLs intraluminales, metabolicen estos CLs generando AGs que serían sustrato de la síntesis de lipoproteínas [468]. En este mecanismo de transferencia de lípidos de los CLs a las VLDL también participaría la proteína **CideB**, que interacciona con la apolipoproteína ApoB [258].

### 6.4.5 Señalización celular

Los AGs derivados de los CLs pueden unirse a determinados **factores de transcripción** modulando su actividad y por lo tanto la expresión génica. Entre estos factores de transcripción, los más estudiados son los de la familia **PPAR** (*peroxisome proliferation activator receptor*).

En esta familia, **PPAR $\alpha$**  y **PPAR $\delta$**  se expresan en tejidos oxidativos y regulan las vías metabólicas que promueven la oxidación de los AGs, esencialmente para la producción de energía. **PPAR $\gamma$**  realiza funciones opuestas, promoviendo la lipogénesis y la síntesis lipídica, expresándose en gran medida en el tejido adiposo blanco. Además de su unión al ligando, esta familia de factores de transcripción requiere de la heterodimerización con el factor de transcripción nuclear RXR y de la interacción con determinados cofactores como PGC-1 en el caso de PPAR $\gamma$  [432].

Recientemente se ha descrito que para activar PPAR $\alpha$ , es necesaria la lipólisis [430, 432], y por lo tanto, los AGs que activan estos factores de transcripción procederían preferentemente de la lipólisis. Además, ratones deficientes en HSL tienen una menor expresión de los genes diana de PPAR $\gamma$  en el tejido adiposo [432].

Otro efecto de los AGs en la señalización es el comentado anteriormente, en

que los AGs, esencialmente los saturados, como el ácido palmítico, promueven la formación de determinadas especies lipídicas como DAG de cadena saturada o ceramidas que interfieren en la señalización de insulina pudiendo llegar a causar resistencia a la insulina.

# FUNCIONES DE LOS CUERPOS LIPÍDICOS EN DIFERENTES TEJIDOS

Los CLs en mamíferos realizan algunas funciones comunes, como el almacén de lípidos para obtener energía o como mecanismo protector frente a la lipotoxicidad. Como hemos comentado en el primer apartado de esta introducción, además, los CLs realizan diversas funciones específicas para cada tejido como el aporte de lípidos para su secreción en sangre, en el tejido adiposo, o el aporte de sustratos para la síntesis de cuerpos cetónicos en el hígado. Las funciones específicas de los CLs en cada tejido están detalladas en la Tabla 2.

Tipo celular	Funciones fisiológicas de los CLs
<b>Adipocitos blancos</b> (Tejido adiposo blanco)	Captación, almacén de AGs procedentes de quilomicrones y VLDLs y secreción de AGs libres a la sangre en respuesta a hormonas durante el ayuno y ejercicio [3, 51].  Almacén de colesterol y vitaminas liposolubles [8].
<b>Adipocitos marrones</b> (Tejido adiposo marrón)	Almacén temporal de AGs procedentes de lipoproteínas o del tejido adiposo blanco para su $\beta$ -oxidación mitocondrial destinada a la producción de calor o termogénesis [8, 493-495].
<b>Hepatocitos</b> (Hígado)	Acumulación de lípidos procedentes del tejido adiposo durante el ayuno para producir energía y cuerpos cetónicos mediante la $\beta$ -oxidación [496].  Producción de lipoproteínas a partir de AGs externos o sintetizados <i>de novo</i> (previo paso por CLs) [14].  Acumulación de lípidos sintetizados <i>de novo</i> en respuesta a insulina [481, 497].  Acumulación de lípidos necesarios para aportar la energía necesaria para la proliferación durante la regeneración hepática [79, 95, 124-126, 498, 499].  Aporte energético durante la polarización hepática [500].
<b>Células estrelladas</b> (Hígado)	Almacén de ácido retinoico (vitamina A) obtenido de la dieta [501-503].  Aporte energético para la activación de las células estrelladas [318].

<b>Tipo celular</b>	<b>Funciones fisiológicas de los CLs</b>
<b>Enterocitos</b> (Intestino)	Almacén temporal de los lípidos captados de la dieta [8, 504].  Producción de quilomicrones [8].
<b>Células <math>\beta</math></b> (Páncreas)	Acúmulo de lípidos en CLs para evitar la lipotoxicidad de los AGs en situaciones con elevados AGs circulantes [489, 505].
<b>Miocitos</b> (Músculo esquelético)	Almacén de lípidos procedentes del tejido adiposo, hígado o intestino para la producción de energía para la contracción muscular durante el ejercicio [8, 320, 506].  Protección frente a la lipotoxicidad de los AGs.
<b>Cardiomiocitos</b> (Músculo cardíaco)	Almacén de lípidos procedentes del tejido adiposo, hígado o intestino para la producción de energía para la contracción cardíaca [461].  Regulación de la función mitocondrial a través de PPAR $\alpha$ y PGC-1 [507].  Aporte energético para la recuperación post-isquemia [508].  Transporte reverso de TAG (secreción de LDL) para evitar lipotoxicidad [461, 481].
<b>Células pulmonares</b>	Producción de líquido surfactante [509, 510].  Almacén de hidrocarburos aromáticos [511, 512].
<b>Leucocitos</b> (Sistema inmune)	Producción de eicosanoides [8, 232, 513, 514].  Almacén de citoquinas como TNF $\alpha$ , bFGF o IL-16 [513].
<b>Macrófagos</b> (Sistema inmune)	Transporte reverso de colesterol: almacén temporal de colesterol (protegiendo de la lipotoxicidad a las células) captado de VLDL para secretarlo e incorporarlo a las HDL [8, 469, 515, 516].  Aporte energético para la fagocitosis [490].
<b>Células dendríticas</b> (Sistema inmune)	Presentación de antígenos a linfocitos T CD8+ [517].  Lucha contra infecciones víricas [14, 518].
<b>Mastocitos</b> (Sistema inmune)	Maduración y síntesis de mediadores inflamatorios durante el proceso de diferenciación [83, 519].

Tipo celular	Funciones fisiológicas de los CLs
<b>Neuronas</b> (Cerebro)	Aporte energético en situación de ayuno [234].  Regulación de la sensación de hambre en las neuronas del hipotálamo [478, 520].
<b>Células del epitelio pigmentado</b> (Retina)	Almacén de ácido retinoico para la regeneración de los pigmentos visuales durante el ciclo del ácido retinoico [521].
<b>Células del epitelio mamario</b> (Glándula mamaria)	Acumulación de lípidos en CLs para su exocitosis en la leche materna [8, 522-524].
<b>Células esteroideogénicas</b>	Aporte de lípidos para la producción mitocondrial de hormonas esteroideas [8, 352, 525, 526].  Producción de eicosanoides en ovarios [513].
<b>Células de Sertoli</b> (Testículos)	Acumulación de lípidos procedentes de la fagocitosis de células germinales apoptóticas en situación de hipertermia testicular, para el aporte de energía y sustratos para la biosíntesis de nuevas células germinales [527, 528].

**Tabla 2. Principales funciones de los CLs en los diferentes tejidos.**

Además de estas funciones, una menor acumulación de CLs se ha relacionado con la longevidad en diferentes organismos modelo y en humanos [529-531]. En *C. elegans*, una mayor activación de la lipólisis y autofagia en los almacenes lipídicos prolonga su esperanza de vida, pudiendo tener un papel en ello los AGs poliinsaturados  $\omega$ -6 liberados durante la lipólisis [532, 533]. Por otro lado la reducción de la lipólisis en *Drosophila* o en ratones merma la longevidad de estos animales [534, 535].

La activación de la  $\beta$ -oxidación y síntesis de mitocondrias en tejido adiposo de ratones se ha descrito que incrementa la longevidad [536]. Así, una posible explicación al rol de los CLs en la longevidad sería la activación de redes bioquímicas que promueven la biogénesis de mitocondrias y la  $\beta$ -oxidación en el tejido adiposo, que reduciría los niveles de AGs saturados secretados reduciendo la lipotoxicidad en otros tejidos [537].

Como hemos visto, los CLs ejercen diferentes funciones según el tejido. Del mismo modo, existen patologías asociadas a los CLs que afectan específicamente

mente algunos tejidos. Muchas de ellas asociadas a las múltiples alteraciones en diferentes órganos asociadas a la obesidad, que han sido agrupadas en el llamado síndrome metabólico. La siguiente tabla (Tabla 3) resume las patologías más relevantes asociadas a los CLs en los diversos tejidos.

Tipo celular	Patologías asociadas a los CLs
<p><b>Adipocitos blancos</b> (Tejido adiposo blanco)</p>	<p><u>Obesidad</u>: Acumulación excesiva de grasa en los adipocitos. Cuando la cantidad de AGs excede la capacidad de almacenaje del tejido adiposo (definida por la cantidad de adipocitos y la capacidad de expansión de éstos), se genera resistencia a la insulina en el tejido adiposo e inflamación. Además de hiperlipemia y acumulación de lípidos en otros tejidos, provocando lipotoxicidad y resistencia a la insulina (Diabetes de tipo II) [1, 493, 538-540].</p> <p><u>Lipodistrofias</u>: Pérdida de tejido adiposo, generalizada o parcial, provocando la acumulación de lípidos en otros tejidos asociada a lipotoxicidad y resistencia a insulina. También se da una reducción de leptina y adiponectina en sangre. Las lipodistrofias están causadas por la mutación en proteínas implicadas en la síntesis (AGPAT2 y Lipina-1) y almacén de TAG en CLs (Seipina), en la formación y regulación de éstos (CiceC/Fsp27, Plin1/Perilipina, Akt, Caveolina-1 y cavina-1) o en la diferenciación de adipocitos (PPAR<math>\gamma</math>, LáminaA/C y ZMP-STE24) [51, 118, 541-550].</p>
<p><b>Hepatocitos</b> (Hígado)</p>	<p>El hígado acumula gran cantidad de CLs en diferentes patologías, <u>daño hepático</u>, <u>obesidad (esteatosis no-alcohólica)</u>, alcoholismo (<u>esteatosis alcohólica</u>) o <u>infección por HCV</u>. En cualquiera de estos casos, se genera lipotoxicidad y resistencia a la insulina. Posteriormente derivan en esteatohepatitis (inflamación) y finalmente en fibrosis y fallo hepático por cirrosis [8, 80, 370, 551-555].</p>
<p><b>Células <math>\beta</math></b> (Páncreas)</p>	<p>La exposición crónica a AGs en la <u>obesidad</u> disminuye la secreción de insulina estimulada por glucosa y provoca la disfunción de estas células [489, 505].</p>
<p><b>Miocitos</b> (Músculo esquelético)</p>	<p>El desequilibrio entre la captación de AGs, la capacidad de acumulación de CLs y su consumo en la mitocondria causa lipotoxicidad y resistencia a la insulina, debido a la acumulación de AGs libres; esta situación se da en <u>obesidad</u> [320].</p> <p><u>Caquexia tumoral</u>: Acumulación de CLs en el músculo debido a una excesiva lipólisis en el tejido adiposo [1, 315] y a una <math>\beta</math>-oxidación insuficiente en los miocitos [316].</p>
<p><b>Cardiomiocitos</b> (Músculo cardíaco)</p>	<p>La acumulación excesiva de CLs asociada a <u>obesidad</u> provoca fallo cardíaco, causado por un desequilibrio similar al expuesto en los miocitos [556].</p>

Tipo celular	Patologías asociadas a los CLs
<b>Macrófagos</b> (Sistema inmune)	<p><u>Aterosclerosis</u>: Los macrófagos fagocitan las lipoproteínas acumuladas en la pared arterial con gran contenido en colesterol y lo acumulan en CLs. Cuando la captación de colesterol excede la capacidad de lipólisis y secreción de colesterol se forman las <i>foam cells</i> que forman las placas de aterosclerosis en la pared arterial. El exceso de lípidos puede conllevar la muerte de estas células atrayendo a más macrófagos [51, 200, 557, 558].</p> <p><u>Infecciones bacterianas</u>, por ejemplo del género <i>mycobacteria</i>, pueden causar la acumulación de CLs en macrófagos [324, 559].</p>
<b>Neuronas</b> (Cerebro)	<p>Mutaciones de <math>\alpha</math>-sinucleína causantes del <u>Parkinson</u> alteran el metabolismo de los CLs en neuronas [560].</p> <p><u>Papaparesia espástica familiar</u>: Mutaciones en la spastina/SPG20 que regula el reclutamiento del proteasoma a los CLs, alteran el recambio de CLs en neuronas motoras provocando su degeneración [1, 14].</p>
<b>Retina</b> (Ojos)	<p>La formación deficiente o la metabolización defectuosa de CLs en estas células provoca defectos en la visión [521].</p>

**Tabla 3. Principales patologías asociadas a los CLs en los diferentes tejidos.**

Además de estar asociados a enfermedades en tejidos específicos, los CLs se acumulan en muchos tipos de cáncer [82, 561-570], posiblemente debido a la mayor síntesis *de novo* de AGs [571-573], necesaria para la proliferación [565], migración y metástasis [574-576], o a la hipoxia presente en algunas zonas del tumor [577]. El contenido de CLs correlaciona con una mayor agresividad tumoral y proteínas residentes en CLs se usan para la detección de tumores.

La  $\beta$ -oxidación de AGs también es relevante en algunos cánceres [312, 317, 479, 578-581], y podría ser importante para la supervivencia a la *anoikis* o muerte por pérdida de adhesión [582, 583]. Además, los CLs también promueven la síntesis de mediadores inflamatorios que participan en la patogénesis tumoral [573, 584] y algunas células tumorales secretan factores que promueven la acumulación de CLs en células vecinas [585]. En otros casos células de diferentes tumores son capaces de captar AGs de adipocitos adyacentes para obtener energía [581, 586].







---

# OBJETIVOS

Durante los últimos años, en el grupo del Dr. Albert Pol se ha estudiado el papel de la caveolina-1 en la homeostasis del colesterol, con especial interés en el modelo hepático.

La detección del dominante negativo de caveolina (Cav-DGV) en los CLs [117] llevó a estudiar la localización de las caveolinas en los CLs y su transporte hasta éstos desde el RE y la membrana plasmática [115]. Nuestro grupo ha demostrado que lípidos como el colesterol y los AGs regulan el transporte de caveolina-1 hacia los CLs [114, 115]. También se detectó esta proteína en CLs durante la regeneración hepática y se demostró que Cav-DGV, además de alterar la homeostasis del colesterol, inhibía la movilidad y el metabolismo de los CLs [115], relacionando ambos procesos. Estos resultados llevaron a analizar el posible papel de caveolina-1 durante la regeneración hepática. Para este proceso es necesaria la acumulación de CLs en los hepatocitos, y nuestro grupo demostró que los ratones deficientes en caveolina-1 no acumulan estos orgánulos y mueren por falta de regeneración del hígado [124]. Además, se demostró que el aporte de glucosa permitía la regeneración hepática de estos ratones, apuntando a una dependencia de la glucosa para proliferar en las células deficientes en caveolina-1.

Por otro lado, dada la importancia de la acumulación de CLs durante el proceso de regeneración hepática, en nuestro grupo se analizó el proteoma de los CLs acumulados en esta situación, describiéndose la proteína ALDI como una nueva proteína residente en CLs [70]. En este trabajo se analizó el transporte de ALDI desde el RE hasta los CLs formados en respuesta a AG, hecho que llevó al grupo a estudiar la vía de transporte de proteínas desde el RE hasta los CLs, describiendo las secuencias proteicas necesarias para dicho transporte [204].

La acumulación de CLs es necesaria para la regeneración hepática pero también es un factor común en múltiples enfermedades que afectan al hígado, y los mecanismos que regulan esta acumulación y la metabolización de CLs en las células son poco conocidos.

Como comentamos a continuación, esta tesis se inscribe en cuatro proyectos diferentes llevados a cabo en nuestro laboratorio relacionados con la caveolina-1 y la biología celular de los cuerpos lipídicos.

Con los antecedentes anteriores nos propusimos los siguientes objetivos:

1. Determinar las causas de la dependencia de la glucosa para la proliferación en modelos deficientes en caveolina-1.
2. Estudiar la formación de CLs en el RE usando como modelo un péptido con la secuencia mínima de direccionamiento a CLs desde el RE.
3. Caracterizar los factores que modulan la acumulación final de CLs en las células, y su metabolismo, con especial interés en el modelo hepático.
4. Analizar la relación entre el movimiento de los CLs y su metabolización.





---

# RESULTADOS

Los Resultados presentados en esta Tesis se dividen en cuatro bloques correspondientes a diferentes proyectos llevados a cabo en nuestro grupo a lo largo de estos años.

El primer bloque de resultados responde al primer objetivo planteado y se inscribe en el proyecto llevado a cabo por la Dra. Marta Bosch dedicado al estudio de la implicación de la caveolina-1 en el metabolismo celular, en el que participé durante los primeros años de esta tesis, por lo que algunos de los experimentos presentados han sido realizados por Marta. Este proyecto sigue la línea iniciada por el estudio previo del grupo, en que se sugerían defectos metabólicos causados por la deficiencia de caveolina-1 [124]. En este apartado demostramos que la deficiencia en caveolina-1 conlleva un incremento de colesterol en las mitocondrias provocando su disfunción y la consecuente dependencia de la glucosa para la supervivencia de estas células. Los resultados presentados de este bloque corresponden a la parte en que participé del proyecto y la publicación realizada por el grupo en 2011 en *Current Biology* (Anexo, [587]).

El segundo bloque de resultados consiste en el estudio de la biogénesis de los CLs en el RE. Estos resultados parten del estudio donde describíamos las señales proteicas necesarias para direccionar proteínas desde el RE hasta los CLs y de la tesis del Dr. Adam Kassan realizada en este laboratorio. En estos trabajos se construyó un péptido con la información mínima necesaria para la localización en los CLs. En este bloque de resultados se ha caracterizado este péptido como marcador de las etapas tempranas de la biogénesis de CLs y demostrado la presencia de la proteína ACSL3 en los CLs nacientes y su participación en la acumulación de CLs. Los resultados presentados de este bloque corresponden a la parte en que participé del proyecto y la publicación realizada por el grupo en 2013 en *Journal of Cell Biology* (Anexo, [588]).

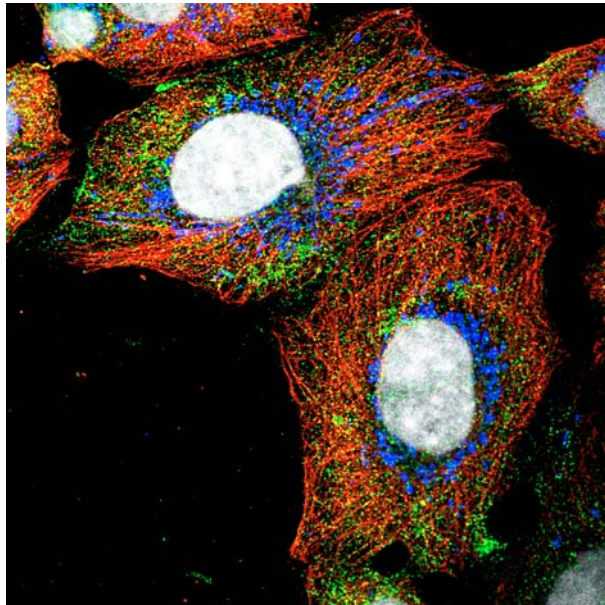
Partiendo de la importancia de la acumulación de CLs en determinados procesos como la regeneración del hígado, en el tercer bloque de resultados pasamos a estudiar los factores que afectan a la acumulación de CLs en diferentes modelos celulares, con especial interés en el modelo hepático. Además, en este modelo analizamos la heterogeneidad intercelular en la acumulación de estos orgánulos y los factores que la modulan. En este apartado se describe que algunas células acumulan más CLs protegiendo al resto de la lipotoxicidad causada por los AGs. Los resultados sugieren que la acumulación heterogénea de CLs sería un mecanismo de protección frente a los efectos tóxicos causados por los AGs. La mayor parte de estos resultados fueron publicados por el grupo en

2013 en *Current Biology* (Anexo, [589]).

Finalmente, en el cuarto bloque de resultados se estudia la relación de la localización y movilidad de los CLs con el destino metabólico de los AGs contenidos en éstos. Este apartado parte del estudio explicado anteriormente [115] donde se observó que el dominante negativo Cav-DGV inhibía la metabolización y la movilidad de los CLs, sugiriendo una interrelación entre ambos procesos. En este bloque describimos que en fibroblastos, la ausencia de glucosa provoca que los CLs tengan una localización periférica que conlleva una mayor interacción con las mitocondrias y el uso de sus AGs por parte de éstas para la  $\beta$ -oxidación.

En resumen, esta Tesis aborda diferentes aspectos de la biología celular de los CLs, desde su nacimiento en el RE, los factores que regulan su acumulación, su localización e interacción con otros orgánulos, y su metabolización para la síntesis de fosfolípidos o la  $\beta$ -oxidación mitocondrial. Los resultados ponen de manifiesto la íntima relación entre el RE, las mitocondrias y los CLs, tres orgánulos implicados en múltiples procesos de la homeostasis lipídica.





# PAPEL DE LA CAVEOLINA-1 EN EL METABOLISMO

La caveolina-1 regula la formación de caveolas en la membrana plasmática y la homeostasis del colesterol en la célula. Mutaciones en la caveolina-1 y la caveolina-3 se han relacionado con cáncer, distrofia muscular y lipodistrofias [548, 590-596]. Hasta el momento, se desconoce por qué la pérdida o alteraciones en la función de caveolina provocan enfermedades tan diferentes y aparentemente poco relacionadas.

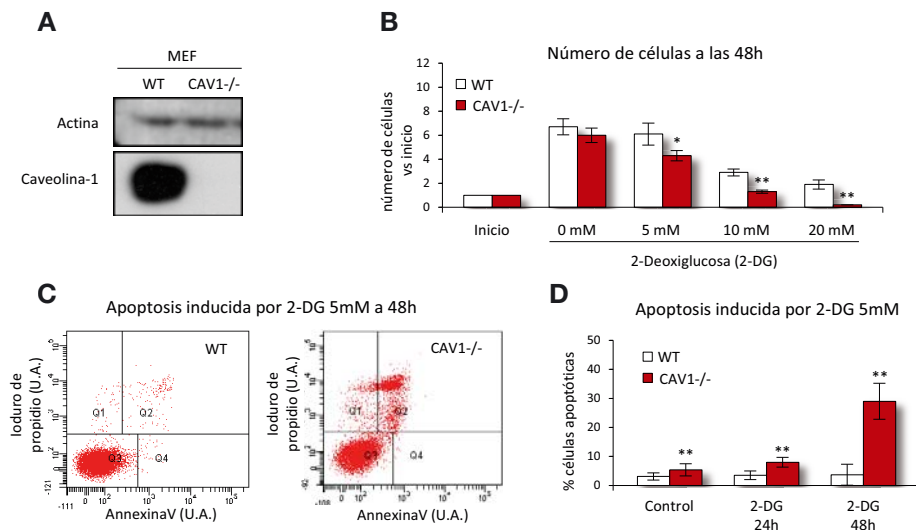
En estudios previos de nuestro grupo se sugería una relación funcional entre caveolina-1 y el metabolismo. Se demostró que la caveolina-1 es necesaria para la correcta proliferación de los hepatocitos durante la regeneración hepática. Los ratones deficientes no regeneraban el hígado y morían después de una hepatectomía parcial. Durante este proceso, el hígado acumula CLs que usa para la obtención de energía para sostener la proliferación. De forma interesante, los ratones deficientes en caveolina-1 eran incapaces de acumular CLs y regenerar a partir de lípidos, mientras que sí pudieron a partir de glucosa. Además, los hepatocitos aislados de estos ratones también mostraban una dependencia de la glucosa para proliferar [124].

Por lo tanto, este artículo sugiere una implicación de la caveolina-1 en el metabolismo, de manera que células deficientes en esta proteína serían dependientes de glucosa para proliferar.

## 1.1 La deficiencia de caveolina-1 genera células dependientes de glucosa

Para comprobar esta hipótesis se trataron células MEF (fibroblastos embrionarios de ratón) procedentes de ratones salvajes (*wt*) o deficientes en caveolina-1 (*CAV1<sup>-/-</sup>*) [597] con 2-deoxiglucosa (2-DG) (Figura 1 de Resultados, A), con el objetivo de afectar al flujo glucolítico. Esta molécula es un análogo no metabolizable de la glucosa con la que compite inhibiendo su metabolismo [598].

La 2-DG disminuye el número de células de forma significativamente mayor en las células *CAV1<sup>-/-</sup>* (Figura 1B), posiblemente debido a un incremento de la muerte celular (Figura 1C, cuantificado en D).



**Figura 1. Las células deficientes en caveolina-1 son dependientes del metabolismo de la glucosa.** (A) Inmunodetección de caveolina-1, y actina como control de carga, en lisados de células MEF *wt* y CAV1<sup>-/-</sup>. (B) Cuantificación del número de células MEF *wt* y CAV1<sup>-/-</sup> a las 48h de los tratamientos indicados, en relación al punto inicial. (C y D) Diagrama de puntos (C) y cuantificación del porcentaje de células apoptóticas (D) en respuesta a 2-DG 5mM a los tiempos indicados.

Para confirmar la relación entre la deficiencia de caveolina-1 y la dependencia de glucosa se usaron líneas de preadipocitos 3T3L1 transfectadas de forma estable con un siRNA control (3T3L1 +CAV1) o específico para caveolina-1 (3T3L1 -CAV1), generadas en el laboratorio de la Dra. Marta Camps (Departamento de Bioquímica, Universitat de Barcelona). Al igual que las células MEF, las 3T3L1 -CAV1 también mostraron una menor proliferación y una mayor apoptosis al ser tratadas con 2-DG (datos no mostrados).

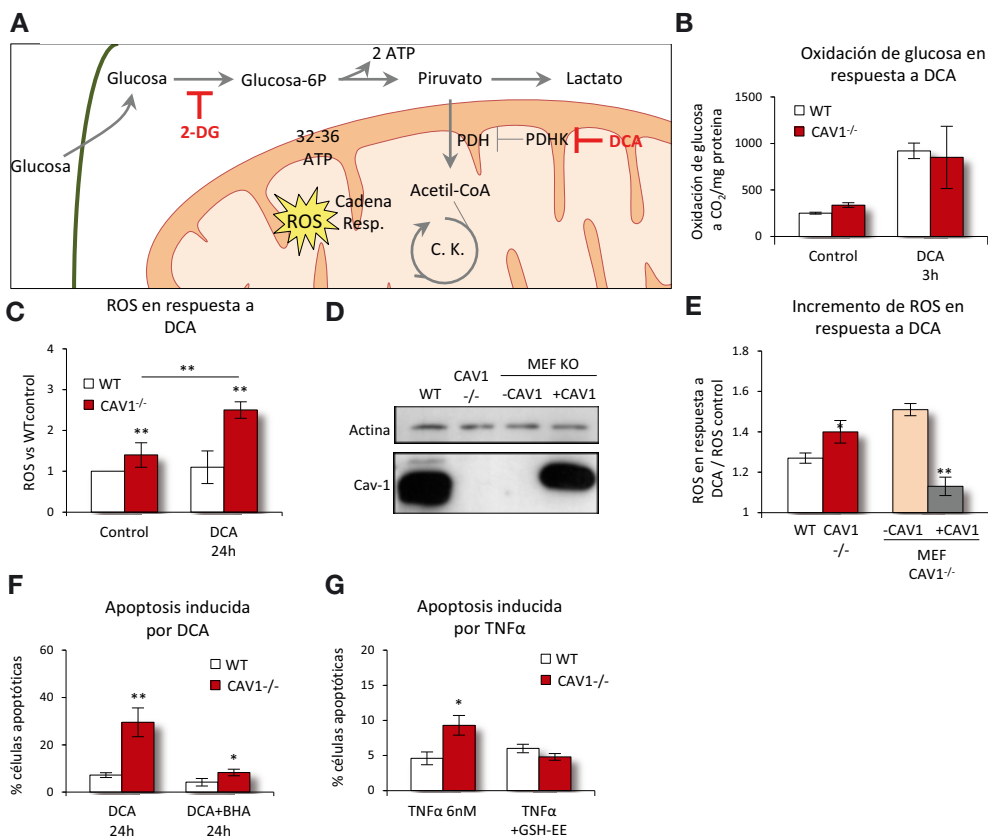
Estos resultados sugieren que las células deficientes en caveolina-1, independientemente de su fondo genético o de la forma en que se redujo la expresión de caveolina, requieren un flujo glucolítico más elevado para mantener su proliferación y supervivencia, indicando una disfunción metabólica.

## 1.2 La activación del metabolismo mitocondrial causa apoptosis por estrés oxidativo en células CAV1<sup>-/-</sup>

Las células en cultivo suelen obtener la energía de la conversión de glucosa a lactato (glucólisis), puesto que en estas condiciones la glucosa no es limitante y esta vía, aunque es menos eficiente que la fosforilación oxidativa, permite la obtención de energía de forma rápida y sin generar estrés oxidativo. Cuando la disponibilidad de nutrientes se reduce, cambian su metabolismo hacia un metabolismo oxidativo mitocondrial [599], aumentando la eficiencia en la obtención de energía. Dado que las células CAV1<sup>-/-</sup> morían por apoptosis al limitar la glucólisis, especulamos que podrían ser incapaces de realizar correctamente dicho cambio metabólico.

Otra forma de forzar el cambio metabólico hacia el metabolismo mitocondrial es el tratamiento con dicloroacetato (DCA), un inhibidor de la piruvato dehidrogenasa quinasa (PDHK) que, a su vez, inhibe la piruvato dehidrogenasa, enzima clave en la captación por parte de la mitocondria de piruvato procedente de la glucólisis (Esquema en Figura 2A). El tratamiento con DCA provoca el uso de glucosa para el metabolismo oxidativo en lugar de su metabolización a lactato [600] (Figura 2B).

El tratamiento con DCA causó un incremento importante en la apoptosis, específicamente en células MEF CAV1<sup>-/-</sup> (Figura 2F, DCA 24h), sugiriendo un defecto en la fosforilación oxidativa. La cadena respiratoria es la principal fuente de especies reactivas de oxígeno (ROS) que generan estrés oxidativo [601] y dicho estrés puede llevar a apoptosis [602]. En consonancia con ello, las células MEF CAV1<sup>-/-</sup> muestran un mayor estrés oxidativo basal, incrementado con el tratamiento con DCA (Figura 2C). Además, la reducción del estrés oxidativo mediante el antioxidante hidroxibutilanisol (BHA), que reacciona con ROS, revierte la apoptosis causada por DCA (Figura 2F, DCA+BHA). Para comprobar que esta respuesta era debida a la ausencia de caveolina-1 usamos MEF CAV1<sup>-/-</sup> en que se reintrodujo caveolina-1 (+CAV1) [603] (Figura 2D). La reexpresión de caveolina-1 en MEF CAV1<sup>-/-</sup> revirtió el incremento de estrés oxidativo causado por el DCA (Figura 2E). El tratamiento con DCA también incrementa significativamente el estrés oxidativo en las células 3T3L1 -CAV1 (datos no mostrados).



**Figura 2. La activación del metabolismo mitocondrial en las células CAV1<sup>-/-</sup> induce estrés oxidativo que causa apoptosis.** (A) Esquema del metabolismo y el efecto de la 2-DG y el DCA. (B) Oxidación de glucosa en células MEF wt y CAV1<sup>-/-</sup> a las 3h de tratamiento con DCA 25mM. (C) Cuantificación de ROS con H<sub>2</sub>DCF-DA en células MEF wt y CAV1<sup>-/-</sup> en medio control o tratadas 24h con DCA 25mM. (D) Inmunodetección de caveolina-1, y actina, en células MEF wt, CAV1<sup>-/-</sup> y CAV1<sup>-/-</sup> en que se ha retransfectado caveolina-1 (+CAV1) o un plasmido control (-CAV1). (E) Incremento de ROS respecto al control en células MEF wt, CAV1<sup>-/-</sup>, -CAV1 y +CAV1 en respuesta a 5h de DCA 50mM, cuantificado con H<sub>2</sub>DCF-DA. (F y G) Porcentaje de células positivas para AnnexinaV en células MEF wt y CAV1<sup>-/-</sup>, tratadas 24h con DCA 25mM o con DCA y BHA 100μM (F) o tratadas con TNFα 6nM o TNFα y GSH-EE 5mM.

Las células deficientes en caveolina-1, tanto MEF (Figura 2G) como 3T3L1 (datos no mostrados), también son más susceptibles a TNFα (que activaría la apoptosis a través de la producción de ROS en la mitocondria [604]) y en consonancia, dicha apoptosis se revierte con glutatión reducido permeable (GSH-EE), antioxidante que disminuye el estrés oxidativo en las células.

En conclusión, la inducción del metabolismo mitocondrial genera estrés oxidativo en células deficientes de caveolina-1 provocando apoptosis. Además, el mayor estrés oxidativo basal en estas células las hace más susceptibles a la apoptosis. Estos resultados sugieren una disfunción mitocondrial en las células que carecen de caveolina-1, acentuada durante la activación del metabolismo mitocondrial.

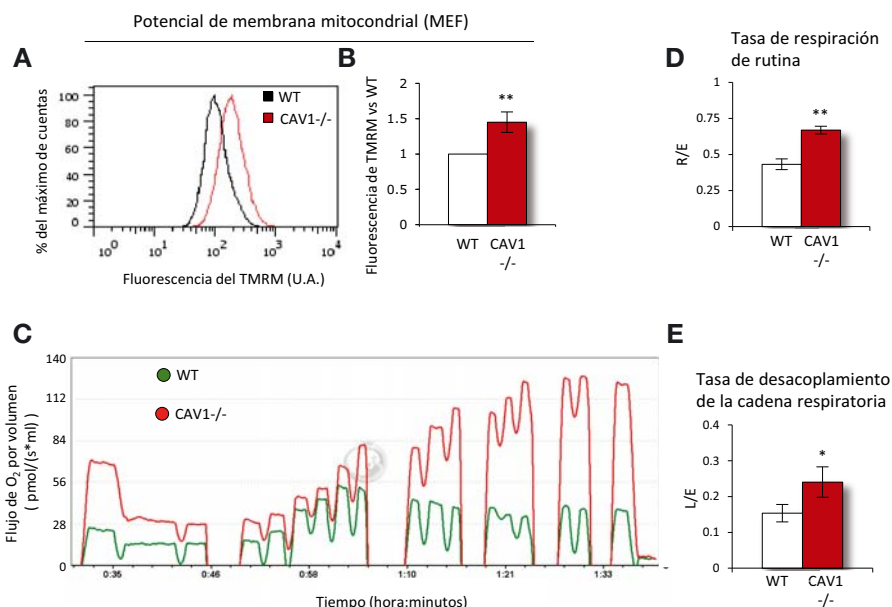
### 1.3 Las células **CAV1<sup>-/-</sup>** muestran una alteración mitocondrial

Para analizar la posible disfunción mitocondrial estudiamos parámetros indicativos de la fisiología de este orgánulo como el potencial de membrana y el consumo celular de oxígeno.

Las células deficientes en caveolina-1, tanto MEF como 3T3L1, tienen un mayor potencial de membrana mitocondrial (Figura 3A, cuantificado en B y datos no mostrados).

Además, mediante respirometría de alta resolución (Figura 3C), se demostró que las células MEF **CAV1<sup>-/-</sup>**, tienen un mayor consumo de oxígeno basal (rutina, R), más próximo a su capacidad de respiración máxima (ETS, E) (Figura 3D). Este resultado se da al tener las células en un medio rico en glucosa. En estas condiciones las células MEF no necesitan realizar metabolismo oxidativo para obtener energía, indicando una posible disfunción. Una mayor ratio R/E indica que estas células tienen menos margen para incrementar el metabolismo oxidativo cuando la situación lo requiere (ver Material y métodos), como sucede frente a la falta de nutrientes o el tratamiento con DCA. En estas células, también se observa una mayor pérdida de protones del espacio intermembrana mitocondrial no asociada a la producción de ATP (L/E) (Figura 3E), indicando un desacoplamiento parcial de la fosforilación oxidativa y la cadena respiratoria.

El mayor potencial de membrana y el desacoplamiento parcial de la cadena respiratoria podrían explicar el estrés oxidativo observado en células deficientes en caveolina-1 [605].



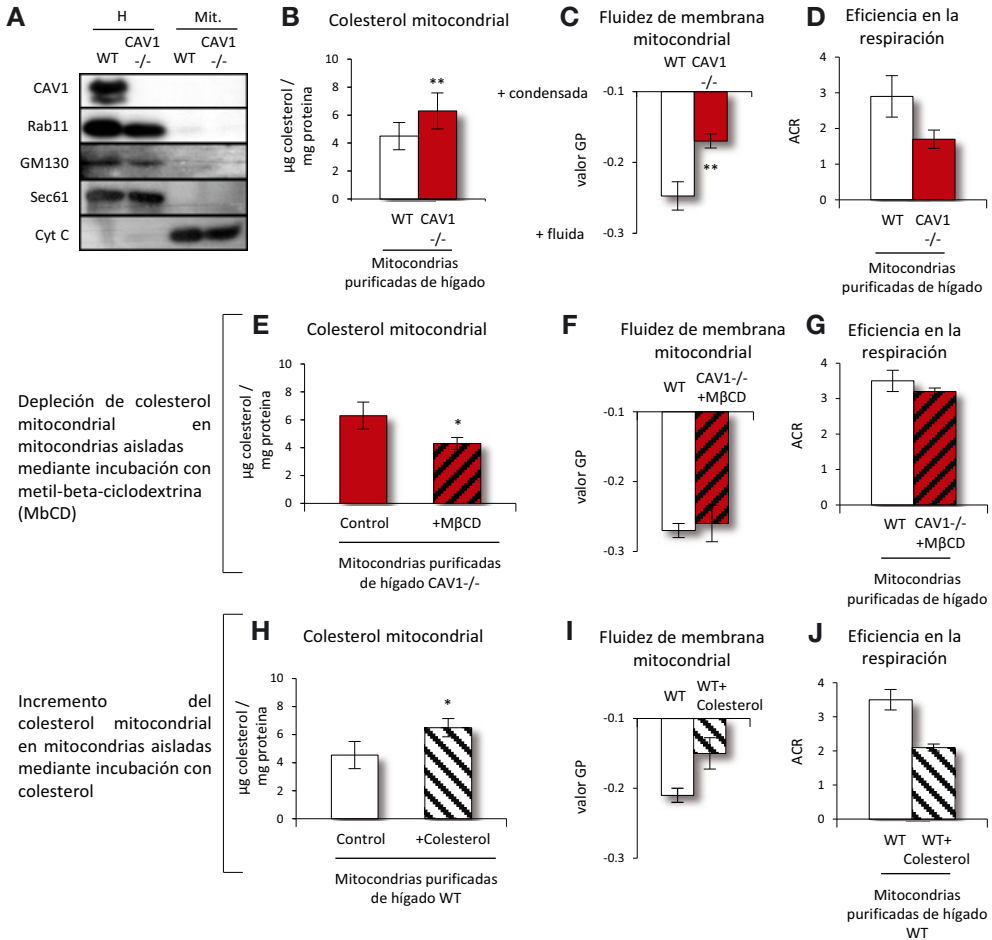
**Figura 3. Las células deficientes de caveolina-1 muestran una alteración mitocondrial.** (A y B) Histograma representativo (A) y cuantificación (B) del potencial de membrana en células MEF *wt* y *CAV1*<sup>-/-</sup> en condiciones control. (C-E) Gráfico representativo (C) y cuantificación de la tasa de respiración de rutina (R/E) (D) y tasa de desacoplamiento de la cadena respiratoria (L/E) (E) cuantificadas mediante respirometría de alta resolución.

En conclusión, las células deficientes de caveolina-1 muestran una alteración mitocondrial, con un mayor estrés oxidativo, que se ve acentuado al forzar las células a usar la mitocondria y que las sensibiliza a la apoptosis.

## 1.4 La disfunción mitocondrial en células *CAV1*<sup>-/-</sup> es debida a un mayor contenido de colesterol mitocondrial

Seguidamente, pasamos a analizar el mecanismo por el cual la falta de caveolina-1 podía provocar tal disfunción mitocondrial. Como se ha comentado anteriormente, la caveolina-1 regula la homeostasis de colesterol en la célula, entre otras vías, permitiendo su transporte desde el RE hasta la membrana plasmática [606]. El grupo del Dr. José Carlos Fernández-Checa (Departamento de muerte celular y proliferación, IIBB-CSIC) demostró que la acumulación de colesterol en las mitocondrias las hacía más susceptibles a la apoptosis [607]. Así, en

colaboración con su grupo, analizamos el contenido de colesterol mitocondrial y la eficiencia respiratoria de mitocondrias aisladas de hígado de ratones *wt* y *CAV1<sup>-/-</sup>* (Figura 4A).



**Figura 4. La deficiencia mitocondrial en modelos deficientes en caveolina-1 es debida a un incremento en el colesterol mitocondrial.** (A) Inmunodetección de caveolina-1 y los marcadores: Rab11( endosomas de reciclaje), GM130 (Aparato de Golgi), Sec61 (RE) y Citocromo C (mitocondrias), en homogenado total y mitocondrias purificadas de hígado. (B, E y H) Cuantificación del colesterol mitocondrial, (C, F y I) análisis por citometría de flujo de la fluidez de membrana mitocondrial mediante la tinción di-4-ANEPPDHQ, y (D, G y J) análisis de la eficiencia de la respiración en mitocondrias aisladas de hígados *wt* o *CAV1<sup>-/-</sup>*, tratadas en los casos indicados con colesterol o metil-β-ciclodextrina. La eficiencia en la respiración se ha calculado como la tasa entre el consumo de oxígeno de las mitocondrias en presencia de succinato 17mM y ADP 0,7mM respecto a la ausencia de ADP.



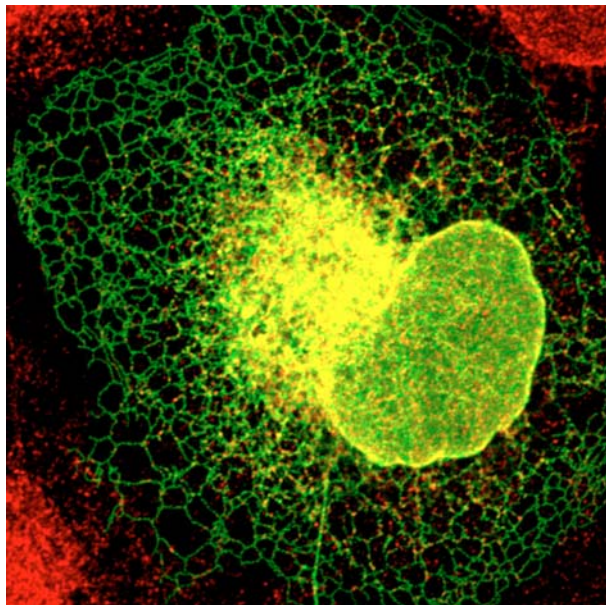
Las mitocondrias procedentes de hígados CAV1<sup>-/-</sup> presentaron un mayor contenido de colesterol y una menor eficiencia en la respiración (Figura 4B y D). Dichos resultados fueron confirmados también en mitocondrias procedentes de células MEF (datos no mostrados). De forma importante, la reducción de los niveles de colesterol mitocondrial mediante metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD) en las mitocondrias CAV1<sup>-/-</sup> aumentaba la eficiencia respiratoria hasta los niveles de las *wt* (Figura 4E y G) y la adición de colesterol a las mitocondrias *wt* reducía la eficiencia en la respiración, de forma similar a la depleción de caveolina-1 (Figura 4H y J).

En general, el contenido de colesterol regula la fluidez de las membranas [608]. Así que aislamos mitocondrias de hígado de ratones *wt* y CAV1<sup>-/-</sup>, y medimos la fluidez de su membrana mediante la tinción de di-4-ANEPPDHQ analizada por citometría de flujo (ver Material y métodos). Las mitocondrias procedentes de hígados CAV1<sup>-/-</sup> mostraron una mayor rigidez de membrana (Figura 4C), y ésta era dependiente del contenido de colesterol, dado que disminuía con la depleción de colesterol mediante M $\beta$ CD (Figura 4F). Además, la adición de colesterol a mitocondrias *wt* incrementó la rigidez de su membrana (Figura 4I).

En conclusión, el colesterol mitocondrial es más elevado en mitocondrias deficientes en caveolina-1, hecho que disminuye la fluidez de la membrana mitocondrial provocando una menor eficiencia en la respiración. Además, en colaboración con el grupo del Dr. Fernandez-Checa hemos demostrado que el mayor contenido de colesterol en mitocondrias deficientes en caveolina-1 provoca una menor captación del antioxidante glutatión en éstas [587] (Anexo). Tanto la menor eficiencia en la respiración como el menor glutatión mitocondrial podrían explicar el mayor estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial observada.

Posteriormente, en el grupo se demostró que las células deficientes en caveolina-1 tenían una menor secreción de colesterol al medio y acumulaban colesterol en el aparato de Golgi y en el RE, especialmente en las MAM (*mitochondrial associated membranes*, regiones del RE en contacto con mitocondrias), probablemente debido a un defecto en el transporte de colesterol desde el RE hasta la membrana plasmática causado por la falta de caveolina-1 [110]. La acumulación de colesterol en el RE y MAM correlacionó con un mayor transporte de colesterol hacia la mitocondria para la síntesis de pregnenolona y con una mayor producción mitocondrial de hormonas derivadas del colesterol [587] (Anexo). Por lo tanto, la acumulación de colesterol en la membrana mitocondrial sería una consecuencia del incremento de colesterol en el RE causado por un defecto en la vía de secreción del colesterol.

Por otra parte, resultados posteriores de nuestro grupo en colaboración con los grupos del Dr. Fernandez-Checa y la Dra. Ester Pérez Navarro (Departamento de Histología, Universidad de Barcelona) demostraron que, como en otros modelos con mayor colesterol mitocondrial [609], la deficiencia de caveolina-1 hace más susceptibles a los animales ante la toxicidad causada por el péptido  $\beta$ -amiloide (causante de la enfermedad de Alzheimer) y al desarrollo de esteatohepatitis; además de ser más susceptibles a la inyección de la toxina mitocondrial ácido 3-nitropropionico en el núcleo estriado, modelo usado para simular la enfermedad de Huntington [587] (Anexo).



# ESTUDIO DE LA BIOGÉNESIS DE CUERPOS LIPÍDICOS Y EL PAPEL DE ACSL3 EN ESTE PROCESO

En estudios previos, nuestro grupo identificó las secuencias necesarias para transportar una proteína desde el RE hasta los CLs ([204] y Tesis del Dr. Adam Kassan). En estos trabajos se determinó que este direccionamiento requiere de la combinación de una secuencia de aminoácidos hidrofóbicos, que permite el anclaje de las proteínas al RE, y una secuencia de aminoácidos de carga positiva, necesarios para el direccionamiento de la proteína desde el RE hasta los CLs.

Con el objetivo de estudiar la biogénesis de los CLs, se sintetizó un péptido con la información mínima necesaria para transportar proteínas desde el RE hasta los CLs (Tesis del Dr. Adam Kassan). Este péptido (**HPos**) se construyó fusionando la secuencia hidrofóbica de ALDI con la secuencia positiva correspondiente a los últimos 20 aminoácidos de caveolina-1. Previamente, nuestro grupo había caracterizado el transporte desde el RE hacia los CLs de ambas proteínas [70, 115] y el papel de estas secuencias en este proceso [204].

Como control negativo para HPoS, se sintetizó un péptido (**HNeu**) con los tres residuos cargados (lisinas y argininas) de la secuencia positiva de caveolina-1 sustituidos por glicinas (de carga neutra), obteniéndose un péptido con una secuencia hidrófoba seguida de una secuencia de carga neutra (Figura 5A). Ambos péptidos fueron conjugados, en su extremo N-terminal, con proteínas fluorescentes de emisión verde (GFP) o roja (ORFP). Para estos estudios se usaron células COS-1, debido a que presentan RE muy bien definido, y han sido frecuentemente usadas para analizar el tráfico de proteínas en este orgánulo [610].

## 2.1 Caracterización de HPoS como marcador de CLs

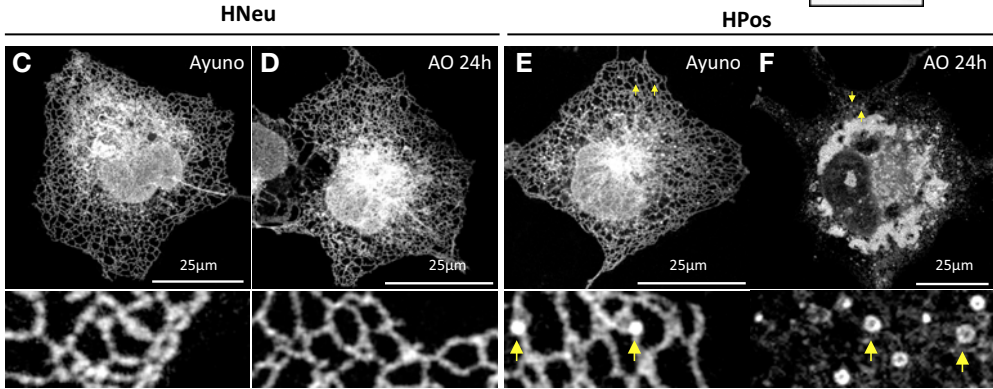
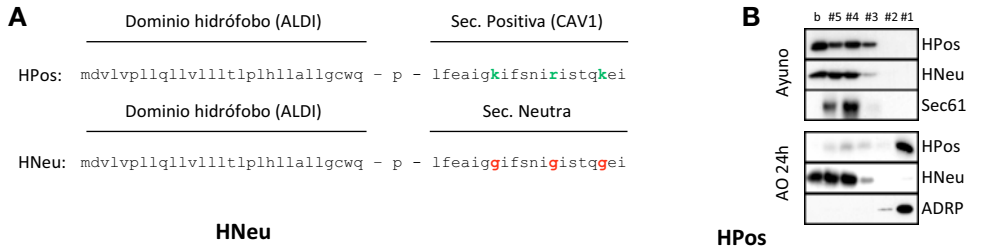
La Figura 5, corresponde a los antecedentes de esta parte del trabajo y resume la síntesis y el estudio de la localización de HPoS y HNeu en respuesta a ácido oleico (AO). En la Figura 5J se muestra un esquema de los experimentos realizados en este bloque de resultados. Inicialmente, se transfectaron ambos péptidos conjugados con GFP en células posteriormente tratadas durante 24h en un medio sin suero (condición referida en esta parte del trabajo como **ayuno**).

En células COS-1, el ayuno de suero permite eliminar los CLs presentes en las células en condiciones normales de cultivo formados a partir de lipoproteínas y ácidos grasos libres (AGs). En estas condiciones, tanto por microscopía confocal (Figura 5C y E) como por fraccionamiento en gradientes de densidad (Figura 5B, panel superior), se demostró que ambos péptidos se acumulaban en el RE.

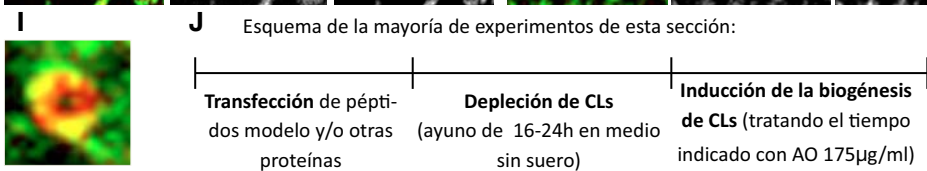
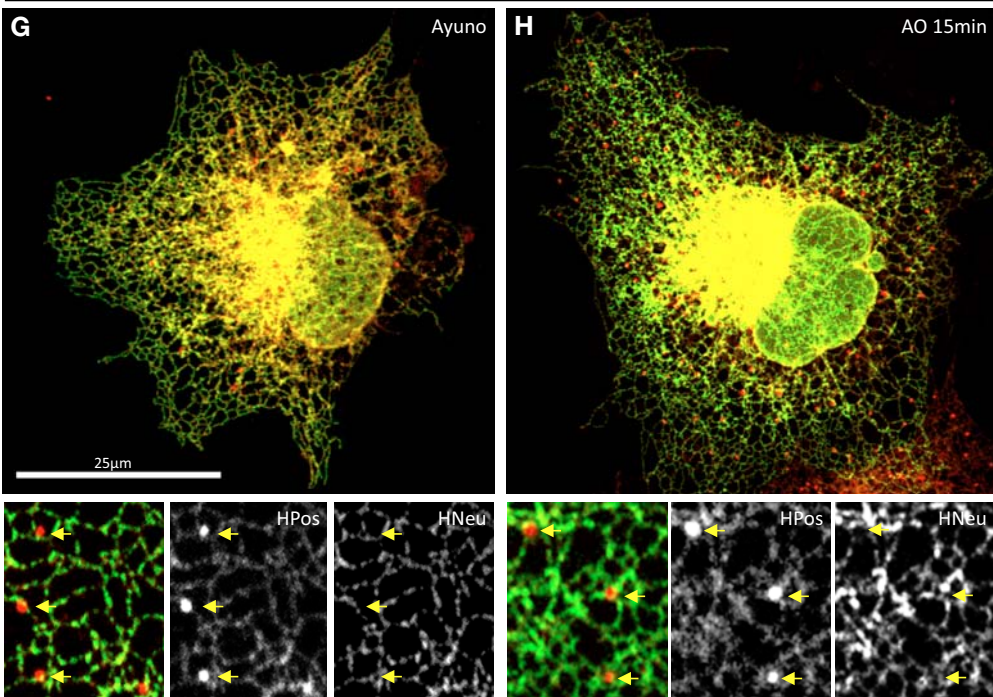
Seguidamente, se indujo la formación de CLs incubando las células 24h con ácido oleico, 175µg/ml (AO). A no ser que se especifique en este apartado los tratamientos con AO se realizan siempre a esta concentración y las células usadas son células COS-1. Después del tratamiento, tanto la microscopía confocal (Figura 5D y F) como el fraccionamiento celular (Figura 5B, panel inferior) revelaron que HPos se encuentra en los CLs. Por lo contrario, HNeu permanece en el RE, confirmando el papel esencial de las cargas positivas en el tráfico de proteínas hasta los CLs. Además, en situación de ayuno, las imágenes de microscopía revelaron la presencia de HPos, pero no de HNeu en unas estructuras aparentemente esféricas y conectadas al RE (flechas en Figura 5E).

La cotransfección de HPos y HNeu confirmó que en ayuno ambos péptidos colocalizan en los túbulos del RE (Figura 5G), excepto en las estructuras esféricas mencionadas anteriormente, que únicamente contenían HPos (detalle en la Figura 5G, panel inferior). La estimulación de la formación de CLs con AO evidenció la segregación de ambos péptidos, observándose, a los 15min de tratamiento,

**Figura 5. Síntesis de los péptidos HPos y HNeu y segregación de éstos en respuesta a AO.** (A) Secuencia de los péptidos modelo HPos y HNeu diseñados para este estudio, formados por la secuencia hidrófoba de la proteína ALDI y la secuencia positiva del extremo N-terminal de la caveolina-1 (HPos) o esta misma secuencia con las tres cargas positivas mutadas a glicina (HNeu). (B) Fraccionamiento celular de células COS-1 transfectadas con GFP-HPos o GFP-HNeu tratadas en medio sin suero durante 24h (Ayuno) o tratadas 24h con ácido oleico 175µg/ml (AO). La localización de los CLs (marcados con Plin2/ADRP) corresponde a la fracción 1 y la localización del RE (marcado con Sec61) corresponde a las fracciones 3-5. (C-F) Células transfectadas con GFP-HNeu (C y D) o con GFP-HPos (E y F) y tratadas 24h en medio sin suero (Ayuno, C y E) o con AO durante 24h adicionales (AO, D y F). En la parte inferior se muestra un detalle del RE periférico de cada imagen. Las flechas amarillas señalan estructuras redondeadas (en ayuno) o CLs (en AO) marcadas por el péptido HPos. (G y H) Co-transfección de GFP-HPos y GFP-HNeu en células posteriormente sometidas a ayuno de suero (G) o 15min adicionales con AO (H). En los paneles inferiores se muestran los canales por separado. Las flechas amarillas señalan las estructuras positivas para HPos. (I) Detalle de un CL maduro en células tratadas como en H después de un tratamiento prolongado con AO. (J) Esquema de la mayoría de experimentos realizados en este apartado de resultados.



HPos / HNeu





numerosas estructuras únicamente marcadas por HPos (Figura 5H). Estas estructuras son aparentemente esféricas (Figura 5H, panel inferior), están repartidas por la red de túbulos del RE y probablemente, están relacionadas con la formación de los CLs. Cabe destacar que mientras que se observa un promedio de 9 estructuras marcadas por HPos en situación de ayuno, al añadir AO se forman más de 40 nuevas estructuras.

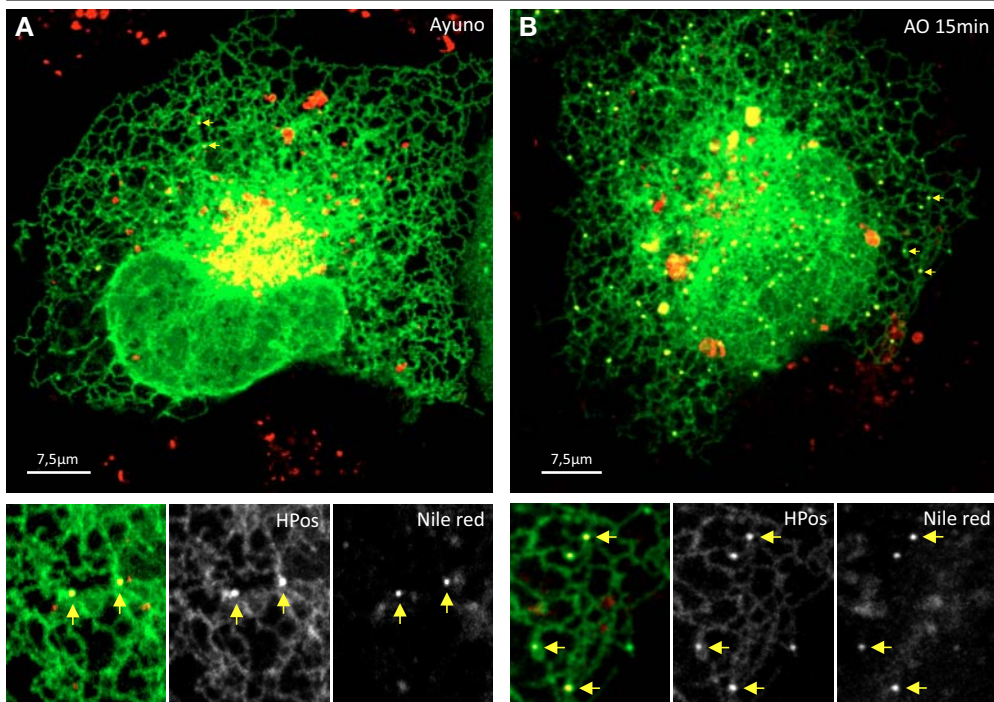
Para estudiar si las estructuras marcadas con HPos, que excluyen HNeu, y corresponden a CLs en formación, analizamos la colocalización de éstas con marcadores de CLs. La sonda lipofílica Nile red demostró la presencia de lípidos neutros en estas estructuras (Figura 6A y B). Además, la mayoría de éstas reclutaron la proteína marcadora de CLs Plin2/ADRP (Figura 6C) y acumularon el AG fluorescente BODIPY-FLC16 durante los primeros 10min de adición de AGs (Figura 6D).

Confirmando la especificidad de HPos como marcador de los CLs en formación, estas estructuras no colocalizaron ni con el marcador de autofagosomas LC3 (datos no mostrados), ni con el marcador de los microdominios de salida del RE (ERES) TANGO1 (datos no mostrados). Además, es importante mencionar que la expresión de HPos no modifica el proceso de biogénesis de los CLs, dado que la acumulación de CLs en las células que expresan HPos es indistinguible de la de las células vecinas no transfectadas (Figura 7).

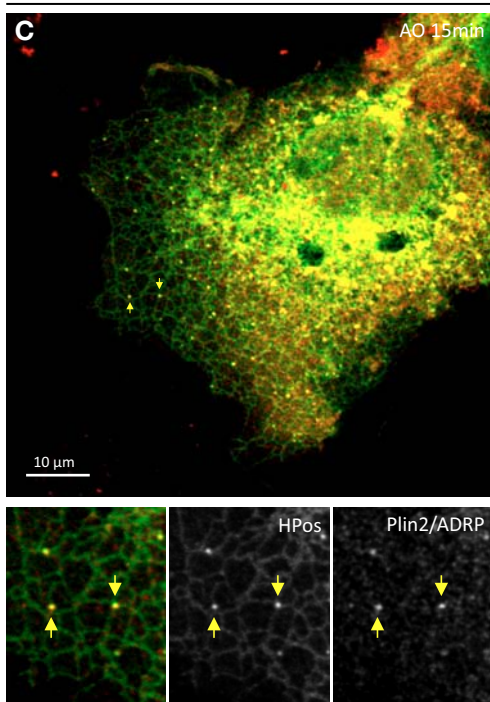
Estos resultados demuestran que HPos es un buen marcador para el estudio de la biogénesis de CLs. A partir de ahora llamaremos CLs pre-existentes (preCL) a aquéllos microdominios de formación de CLs resistentes al ayuno (Figura 6A) y CLs emergentes (emCLs) a los que se forman en respuesta al tratamiento con AGs (Figura 6B).

**Figura 6. El péptido sintético HPos marca la biogénesis de los CLs.** (A y B) Imágenes representativas de células COS-1 transfectadas GFP-HPos (canal verde), tratadas 16h en medio sin suero (Ayuno) y posteriormente incubadas durante 15min con AO. Las células fueron fijadas y teñidas con Nile red (CLs, canal rojo). (C) Células co-transfectadas con GFP-HPos (canal verde) y Cherry-ADRP (canal rojo), ayunadas 16h en medio sin suero y posteriormente tratadas 15min con AO. (D) Células transfectadas con GFP-HPos (canal rojo), ayunadas en medio sin suero y posteriormente tratadas durante 10min con AO y BODIPY-FLC16 1µM (canal verde). (A y B, paneles inferiores). En todos los casos en los paneles inferiores se muestran los canales por separado. Las flechas amarillas señalan las estructuras positivas por HPos.

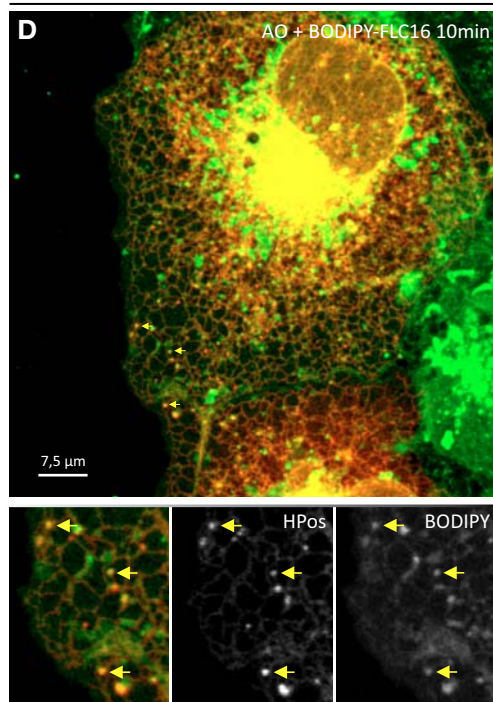
Nile red / HPos



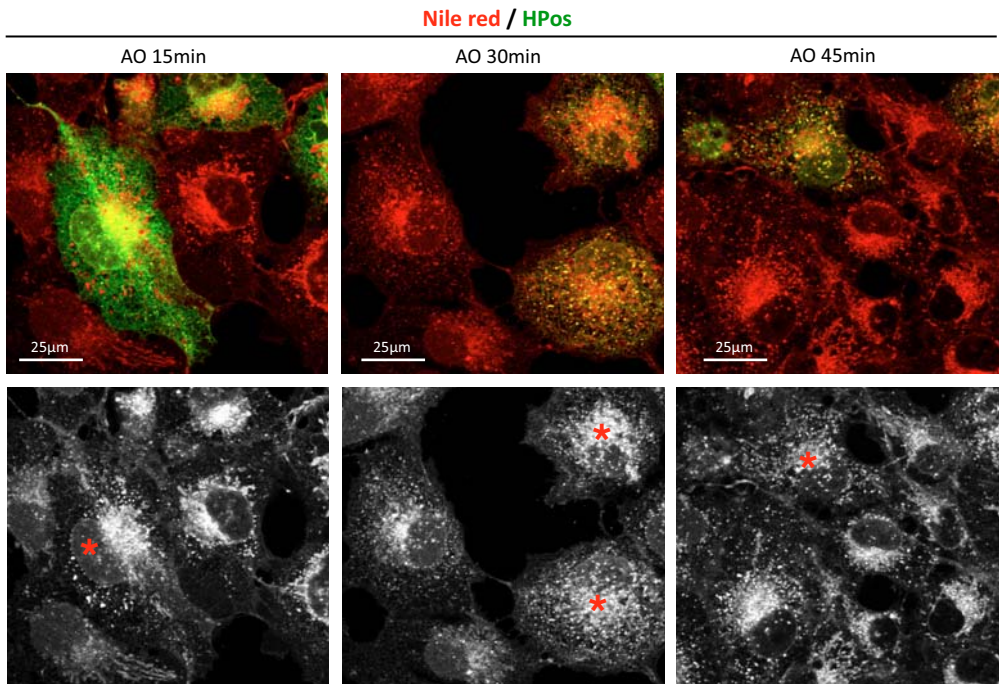
Plin2-ADRP / HPos



HPos / BODIPY-FLC16







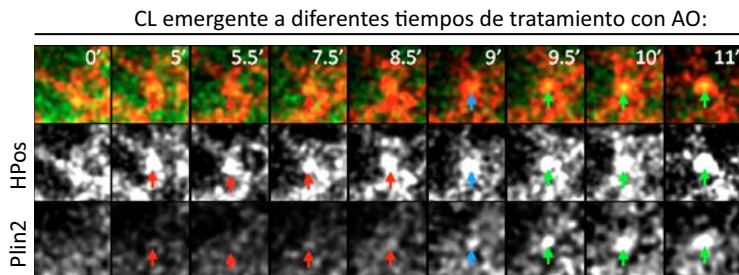
**Figura 7. La transfección del péptido HPos no modifica la biogénesis de CLs.** (Paneles superiores) Imágenes de células COS-1 transfectadas GFP-HPos (canal verde), tratadas 16h en medio sin suero y posteriormente incubadas durante diferentes tiempos con AO. Las células fueron fijadas y teñidas con Nile red (CLs, canal rojo). (Paneles inferiores) Imágenes correspondientes a la tinción de Nile red de los paneles superiores señalando las células transfectadas con GFP-HPos con asteriscos rojos.

## 2.2 El HPos permite la detección de una etapa muy temprana de la formación de CLs

Una vez comprobada la utilidad de HPos como marcador de los CLs en formación, usamos este péptido para analizar mediante video-microscopía confocal la incorporación de lípidos y proteínas a los CLs nacientes. Con esta técnica observamos que el BODIPY-FLC16 se incorpora a los preCLs al cabo de 10-30 segundos de tratamiento, mientras que en el caso de los emCLs, primero se acumula el péptido HPos formando la estructura (hacia los 5-7 minutos de tratamiento) y posteriormente (unos 2-3min más tarde) el BODIPY-FLC16 se acumula en estas estructuras (datos no mostrados procedentes de la Tesis del Dr. Adam

Kassan). Así, tanto los preCLs como los emCLs acumulan AGs pero a tiempos diferentes.

Seguidamente, usamos la misma técnica para analizar la incorporación de Plin2/ADRP a los CLs nacientes. Como en el caso anterior, la formación de emCLs marcados con HPos se observa a los 5-7min, pero la acumulación de Plin2/ADRP a estas estructuras tiene lugar 4-5min después (Figura 8). Estos resultados correlacionan con el progresivo incremento de colocalización entre Plin2/ADRP y HPos observado en CLs emergentes. Además, mediante este método, en nuestro grupo también se corroboró que Plin3/TIP47 se incorpora a estas estructuras antes que Plin2/ADRP, pero después de HPos (datos no mostrados), de forma consistente con la hipótesis según la cual, durante el ensamblaje de CLs, la incorporación de las diferentes proteínas a éstos sucede de forma secuencial [104, 611].

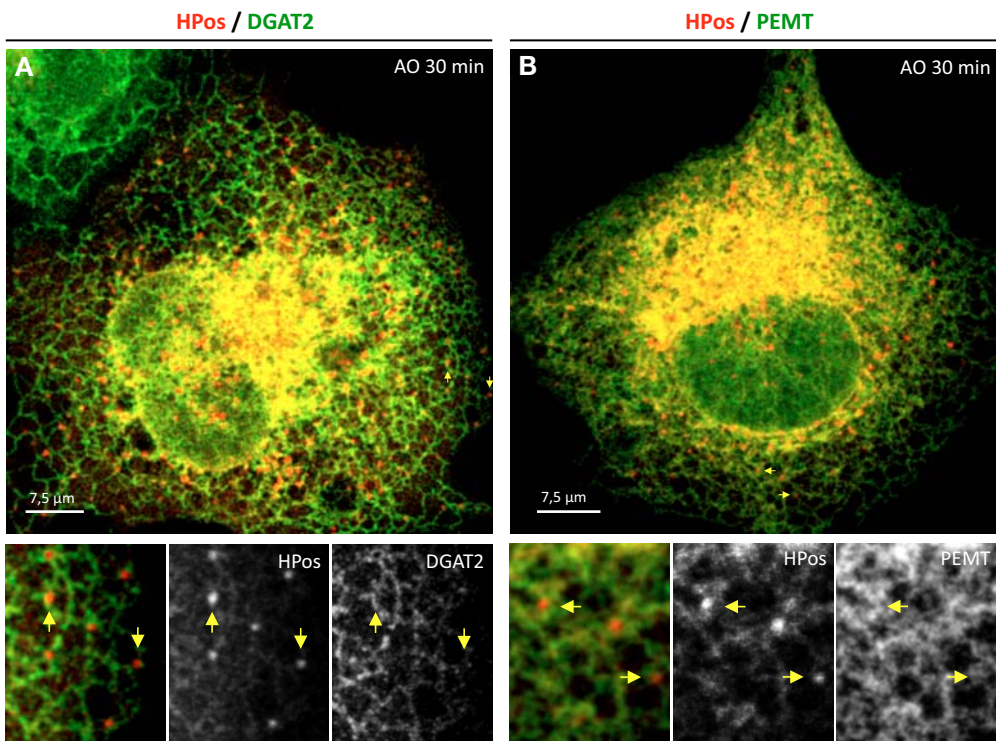


**Figura 8. Análisis de la incorporación de Plin2/ADRP a los CLs nacientes.** Análisis mediante videomicroscopía confocal de la incorporación de GFP-ADRP (canal verde) a los CLs nacientes, definidos por GFP-HPos (canal rojo), en células COS-1 co-transfectadas con ambos péptidos, ayunadas en medio sin suero durante 16h y tratadas con AO. Se han seleccionado imágenes correspondientes a un CL emergente a diferentes tiempos de tratamiento con AO. Los CLs nacientes son inicialmente positivos por GFP-HPos y negativos por GFP-ADRP (flechas rojas) y posteriormente GFP-ADRP es reclutada a estas estructuras (flechas azules para un reclutamiento parcial y verdes para un reclutamiento claro).

## 2.3 Análisis de la incorporación de proteínas a los CLs emergentes

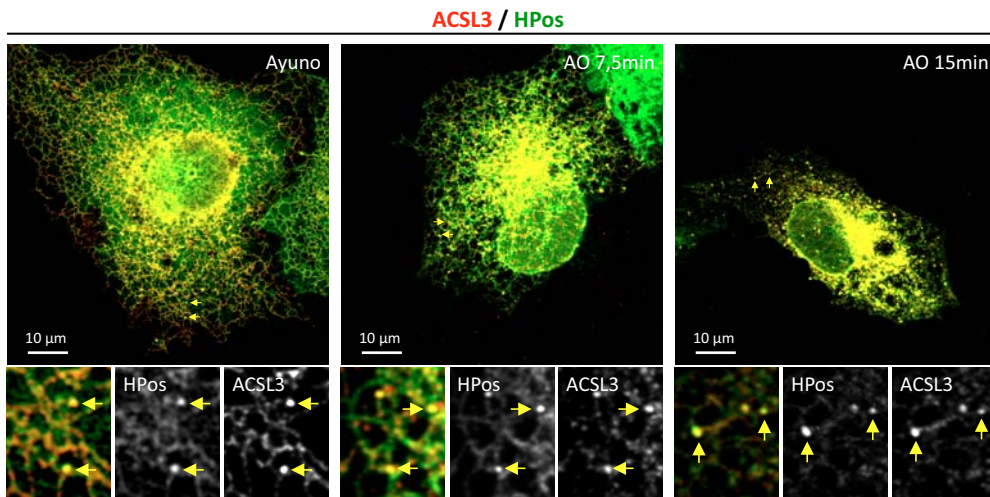
Dada su temprana incorporación a los CLs nacientes, HPos nos permitió analizar la cinética de incorporación de otras proteínas determinantes para la biogénesis de este orgánulo.

Con este objetivo, cotransfectamos HPos con diferentes enzimas implicadas en la síntesis de lípidos neutros y fosfolípidos necesarios para la biogénesis de CLs (ver Introducción) como DGAT2 (Figura 9A), PEMT (Figura 9B), ACAT (datos no mostrados) y ACSL3 (Figura 10).



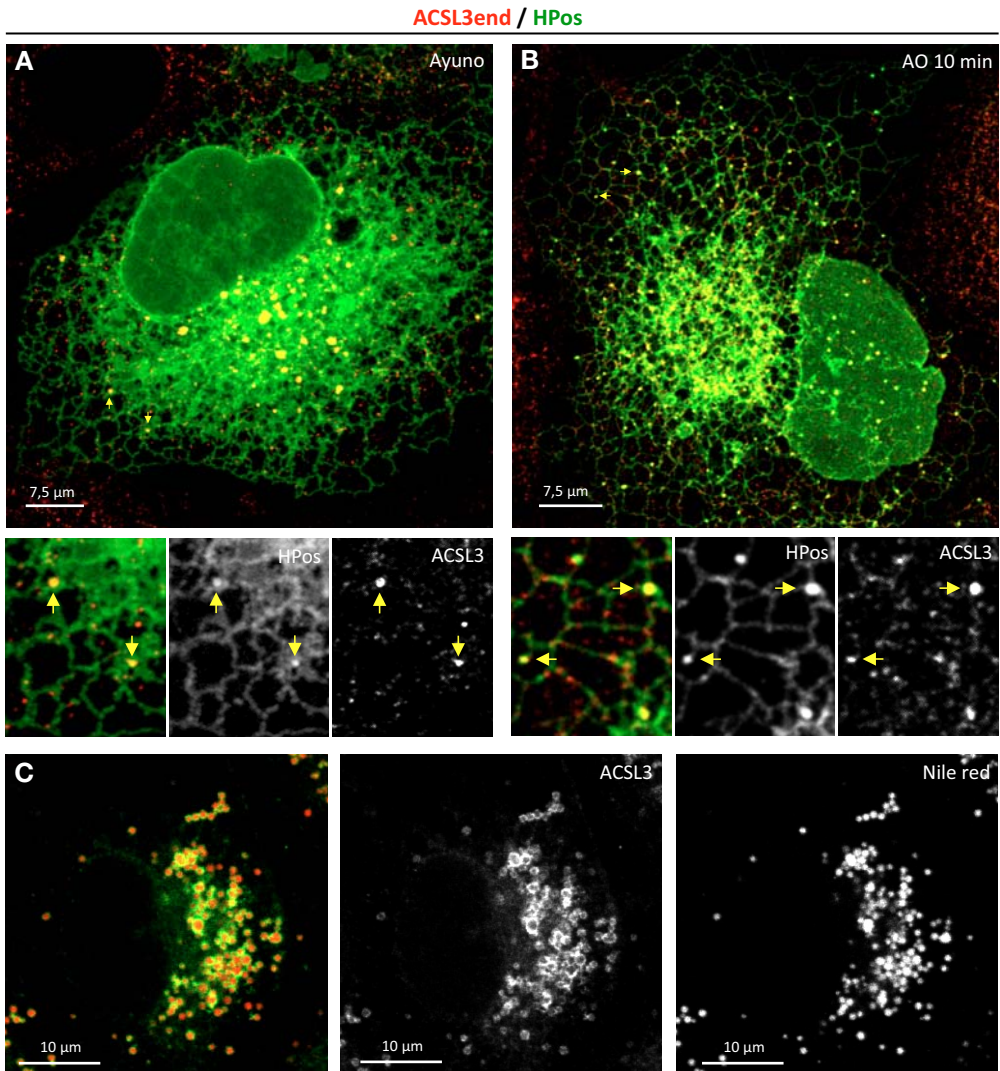
**Figura 9. Localización de DGAT2 y PEMT en la biogénesis de CLs.** (A y B) Co-transfección de GFP-DGAT2 (A) o GFP-PEMT (B) con OFP-HPos en células COS-1, posteriormente ayunadas 16h en medio sin suero y tratadas 30min con AO. En todos los casos en los paneles inferiores se muestran los canales por separado. Las flechas amarillas señalan las estructuras positivas para HPos.

De todas ellas, tan sólo ACSL3 colocalizó con HPos tanto en los CLs pre-existentes (Figura 10, paneles de la izquierda) como en los CLs emergentes (Figura 10, paneles centrales y de la derecha), sugiriendo un reclutamiento temprano de dicha proteína a los CLs. La presencia de la ACSL3 endógena en las estructuras marcadas por HPos fue confirmada mediante inmunocitoquímica, tanto en preCLs (Figura 11A) como en emCLs (Figura 11B) y también en CLs maduros después de horas de tratamiento con AGs (Figura 11C).



**Figura 10. Localización de ACSL3 en la biogénesis de CLs.** Co-transfección de GFP-HPos (canal verde) y myc-ACSL3 (canal rojo) en células COS-1, posteriormente ayunadas 16h en medio sin suero y tratadas los tiempos indicados con AO. En los paneles inferiores se muestran los canales por separado. Las flechas amarillas señalan las estructuras positivas por HPos.

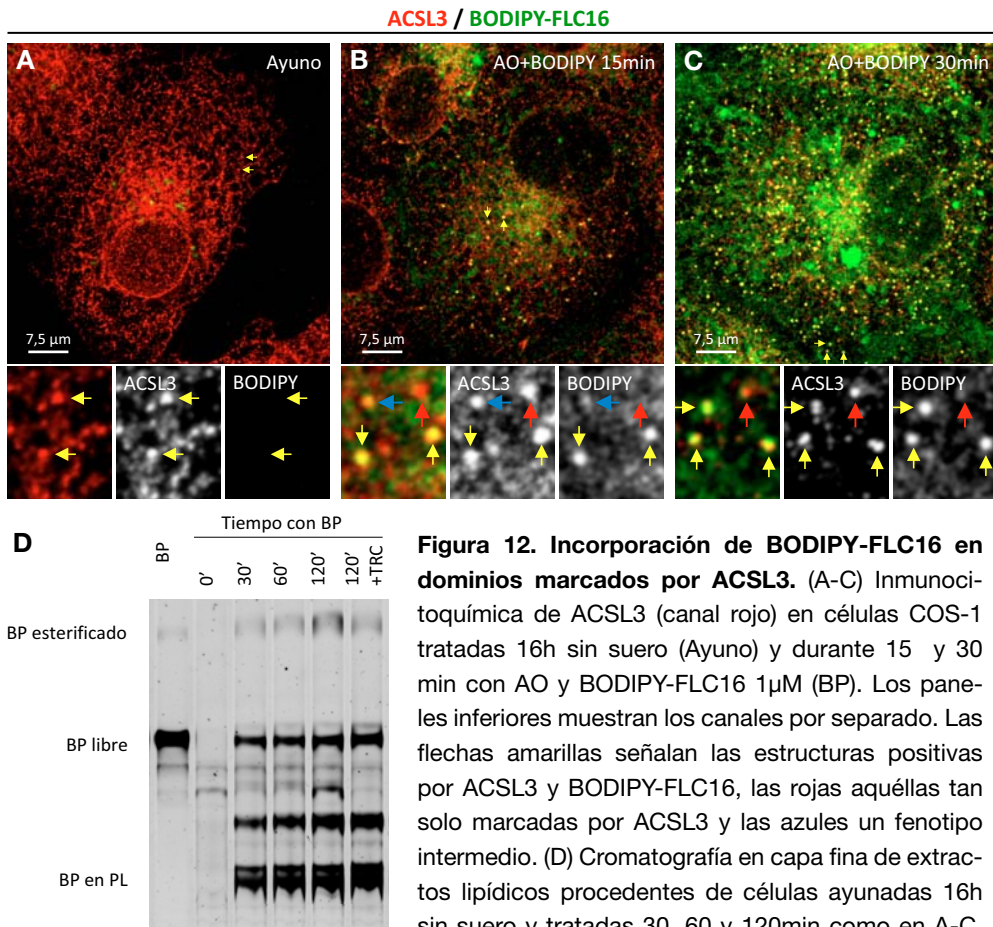




**Figura 11. Localización de ACSL3 endógena en la biogénesis de CLs.** (A y B) Transfección de GFP-HPos (canal verde) en células COS-1, posteriormente ayunadas 16h en medio sin suero (A) y tratadas durante 10min con AO (B). Una vez fijadas las células, se ha detectado ACSL3 endógena por inmunocitoquímica (canal rojo). Los paneles inferiores muestran los canales por separado. Las flechas amarillas señalan las estructuras positivas por HPos. (C) Inmunocitoquímica de ACSL3 (canal verde) en células COS-1 tratadas 24h con AO y teñidas con Nile red (CLs, canal rojo).

## 2.4 La localización de ACSL3 en los CLs nacientes precede a la acumulación de lípidos

La temprana incorporación de ACSL3 a los CLs nos llevó a pensar que podría formar parte de una hipotética plataforma proteica que promovería la incorporación de lípidos y la formación de CLs en determinados microdominios del RE. De ser así, la acumulación de ACSL3 en dichos microdominios, como en el caso del marcador HPos, debería ser previa a la acumulación de lípidos. Mientras que la colocalización de ACSL3 endógena con el marcador HPos en los CLs nacientes es total, se observó que tanto a 15 como 30 minutos de tratamiento con AO,



**Figura 12. Incorporación de BODIPY-FLC16 en dominios marcados por ACSL3.** (A-C) Inmunocitoquímica de ACSL3 (canal rojo) en células COS-1 tratadas 16h sin suero (Ayuno) y durante 15 y 30 min con AO y BODIPY-FLC16 1 $\mu$ M (BP). Los paneles inferiores muestran los canales por separado. Las flechas amarillas señalan las estructuras positivas por ACSL3 y BODIPY-FLC16, las rojas aquellas tan solo marcadas por ACSL3 y las azules un fenotipo intermedio. (D) Cromatografía en capa fina de extractos lipídicos procedentes de células ayunadas 16h sin suero y tratadas 30, 60 y 120min como en A-C.

El último carril corresponde al tratamiento de 120min en presencia de triacsina C 10 $\mu$ M (TRC) para inhibir la esterificación de los AGs. El primero corresponde a BP, usado como estándar.

si bien la mayoría de estos microdominios habían incorporado BODIPY-FLC16, quedaban algunos microdominios solamente positivos por ACSL3 (flechas rojas en Figura 12B y C). Además, se observó que la proporción de microdominios sin BODIPY-FLC16 disminuía al incrementar el tiempo de tratamiento, hecho que podría sugerir una incorporación secuencial, primero de la proteína ACSL3 y posteriormente del AG fluorescente. Cabe destacar que la incorporación progresiva de este AG fluorescente a los CLs nacientes correlaciona con su esterificación, analizada por cromatografía en capa fina (Figura 12D), que se reduce con triacina C (TRC, inhibidor de la actividad ACSL) inhibidor de la activación de AGs a acil-CoA.

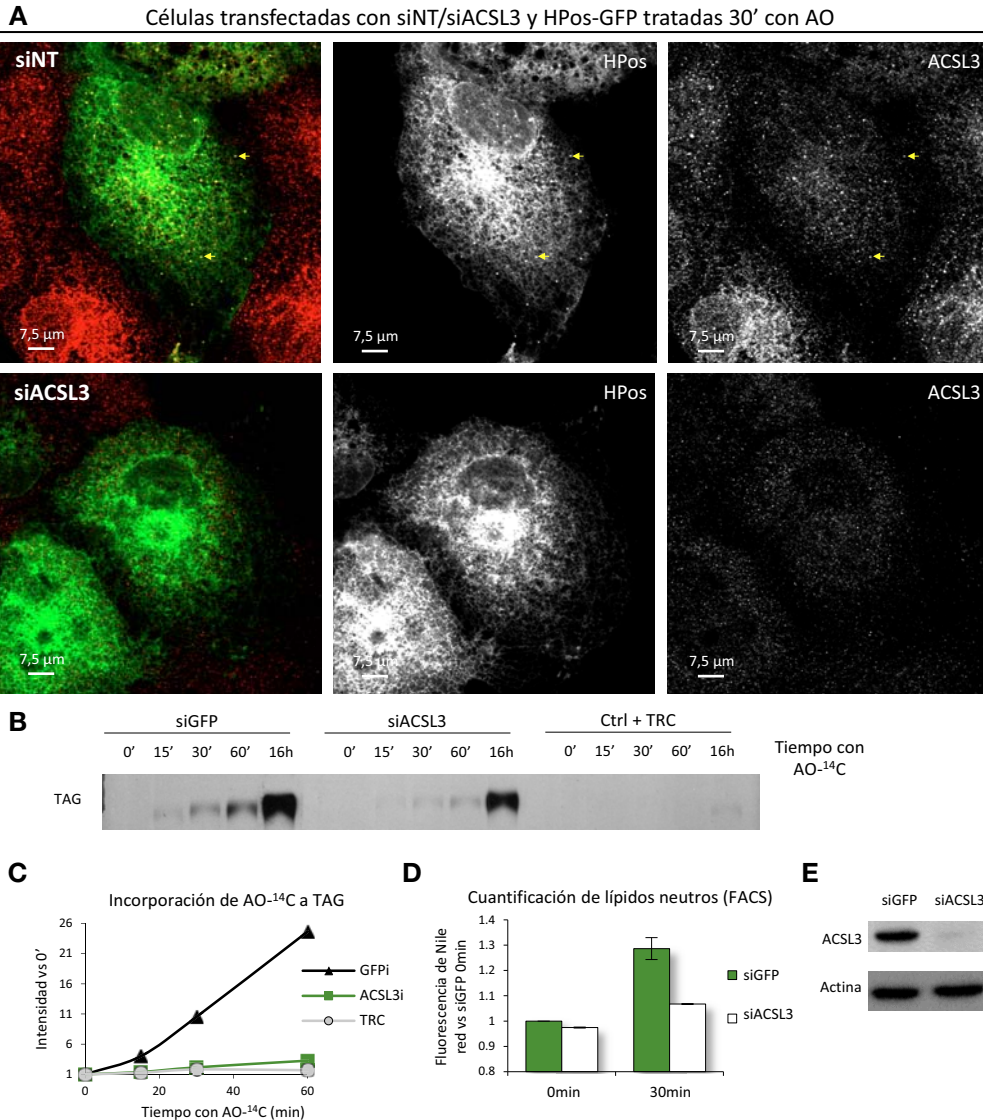
Así, estos resultados demuestran que ACSL3 está localizada en CLs emergentes incluso antes de que estas estructuras acumulen lípidos de forma visible y sugieren que la actividad ACSL es necesaria durante la esterificación de estos lípidos y la formación de CLs.

## **2.5 ACSL3 es necesaria para la biogénesis de los CLs**

El papel de ACSL3 en la acumulación de CLs es controvertido y difiere según el tipo celular analizado y posiblemente también según el origen de los AGs (ver Introducción). Dada su temprana localización en los CLs decidimos analizar el papel de esta proteína en la formación y acumulación de CLs en nuestro modelo.

La supresión de ACSL3 mediante siRNA, comprobada tanto por inmunocitoquímica (Figura 13A, paneles de la derecha) como por *western blot* (Figura 13E), reduce de forma muy importante la cantidad de emCLs a 30' de tratamiento con ácido oleico (AO) (flechas amarillas en Figura 13A). En consonancia con este resultado, durante la primera hora de biogénesis de CLs, la eliminación de ACSL3 también reduce la síntesis de TAG a partir de AO marcado radioactivamente (Figura 13B, cuantificado en C) y la acumulación de lípidos neutros (teñidos con Nile Red) analizada por citometría de flujo (Figura 13D). Por lo contrario, la sobreexpresión de ACSL3 incrementa la biogénesis de CLs a tiempos cortos de tratamiento con AGs (Figura 15F).

Así, la presencia de ACSL3 es necesaria para la formación de CLs y la acumulación de lípidos neutros en células COS-1 a tiempos cortos de tratamiento con ácido oleico.



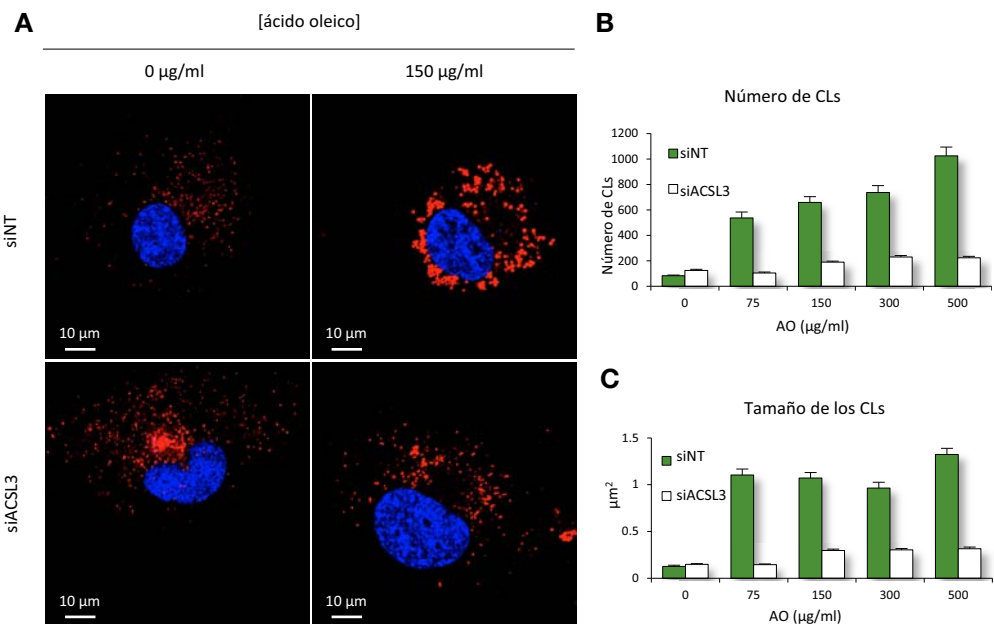
**Figura 13. La presencia de ACSL3 es necesaria para la biogénesis de los CLs.** (A) Inmunocitoquímica de ACSL3 (canal rojo) en células COS-1 transfectadas con siRNA inespecífico (siNT) o anti-ACSL3 (siACSL3), al cabo de 24h transfectadas con GFP-HPos y posteriormente ayunadas 16h en medio sin suero y tratadas con AO durante 30min. Las flechas amarillas indican los CLs nacientes marcados con GFP-HPos y ACSL3. (B y C) Análisis de la incorporación de AO-<sup>14</sup>C en TAG a diferentes tiempos de incubación mediante cromatografía en capa fina en células transfectadas 48h con un siRNA inespecífico (siGFP) o siACSL3, o células control tratadas con triacina C 10μM (Ctrl+TRC), cuantificado en C. (D) Cuantificación de la acumulación de lípidos neutros por citometría de flujo en células tratadas como en A. N=2. (E) Niveles proteicos de ACSL3 y actina en células transfectadas durante 48h con siGFP o siACSL3.

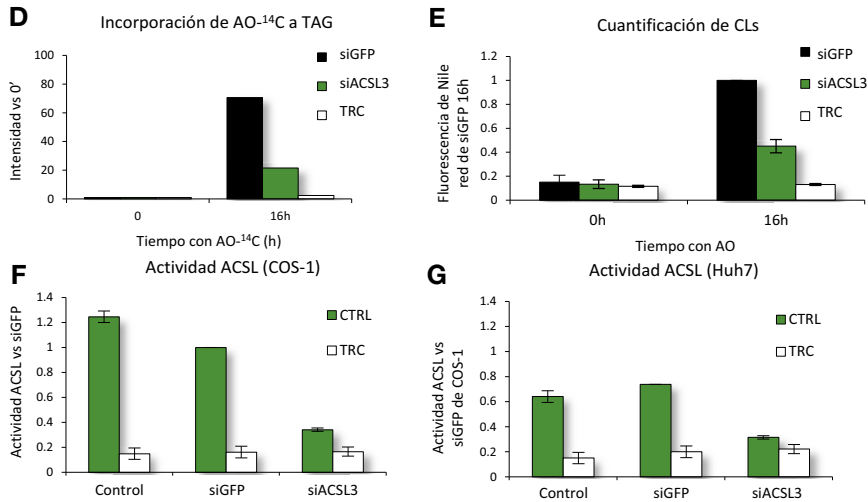


## 2.6 ACSL3 es necesaria para la acumulación de CLs maduros

Además de la formación de CLs nacientes, la depleción de ACSL3 también reduce el número y tamaño de los CLs maduros a las 16h de tratamiento con AO (Figura 14A, B y C), cuantificados en colaboración con Babu JN Reddy del laboratorio del Dr. Steven P. Gross (Universidad de Irvine, USA). Las imágenes fueron tomadas *in vivo* para preservar al máximo el tamaño real de los CLs, evitando posibles eventos de fusión derivados de una imperfecta fijación. Curiosamente, en las células control el tamaño de los CLs se mantiene estable en las diferentes dosis de AO, mientras que el número de CLs incrementa (Figura 14C). Confirmando la importancia de ACSL3 para la acumulación de CLs, su sobreexpresión incrementa el contenido de CLs a 16h de tratamiento con AO (Figura 15G).

Del mismo modo que a tiempos cortos, después de 16h de tratamiento con AO la reducción de ACSL3 también disminuye, aunque de forma parcial, la síntesis de TAG a partir de AO marcado radiactivamente (Figura 13B, cuantificado en Figura 14D) y la acumulación de lípidos neutros (Figura 14E). La inhibición de la actividad ACSL con triacsina C reduce ambos de forma completa, indicando la posible participación de otras isoformas de ACSL sensibles a triacsina C en este proceso. Aun así, la mayoría de actividad ACSL es atribuible a ACSL3 en nuestro





**Figura 14. La presencia de ACSL3 es necesaria para la acumulación de CLs.** (A-C) Células COS-1 transfectadas con siRNA inespecífico (siNT) o anti-ACSL3 (siACSL3) y, al cabo de 24h, tratadas durante 16h con AO a concentraciones crecientes. (A) Imágenes representativas de microscopía confocal *in vivo* de los tratamientos control y con AO 150µg/ml. (B y C) Cuantificación del número y tamaño de CLs en imágenes tomadas como en A en las diferentes concentraciones de AO. (D) Cuantificación de la incorporación de AO-<sup>14</sup>C a TAG a 16h (procedente de la figura 10B) en células transfectadas con siGFP o siACSL3 o células control tratadas con TRC 10µM. (E) Cuantificación de CLs mediante citometría de flujo en células tratadas como en D. N=2. (F y G) Análisis de la actividad ACSL en lisados de células COS-1 (F) y Huh7 (G) control, transfectadas con siGFP o con siACSL3, y tratadas en ausencia (CTRL) o presencia de TRC. N=2. Significaciones siempre calculadas respecto a siGFP CTRL. \*: p-valor<0,05 \*\*: p-valor<0,01.

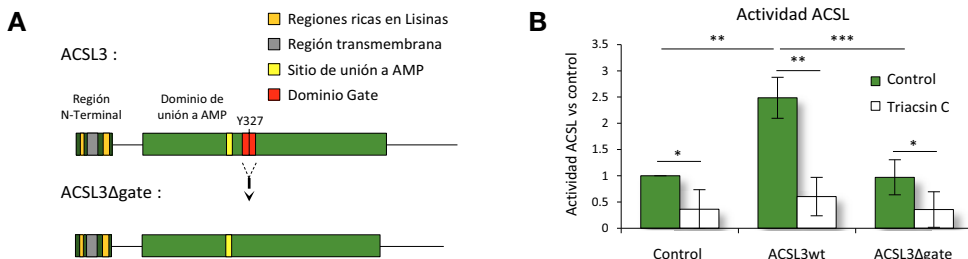
modelo, dado que la depleción de esta proteína reduce de forma muy importante la actividad ACSL total, tanto en células COS-1 como Huh7 (Figura 14F y G).

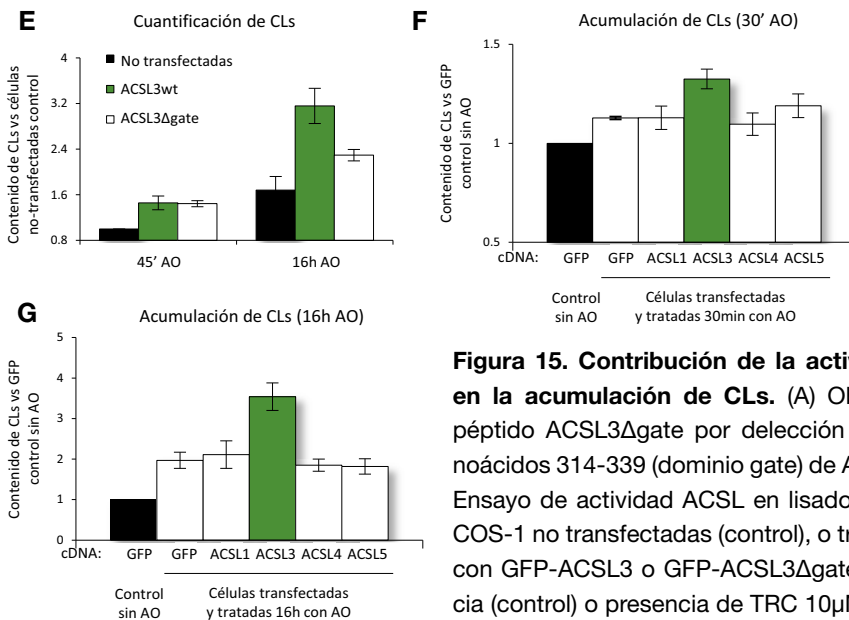
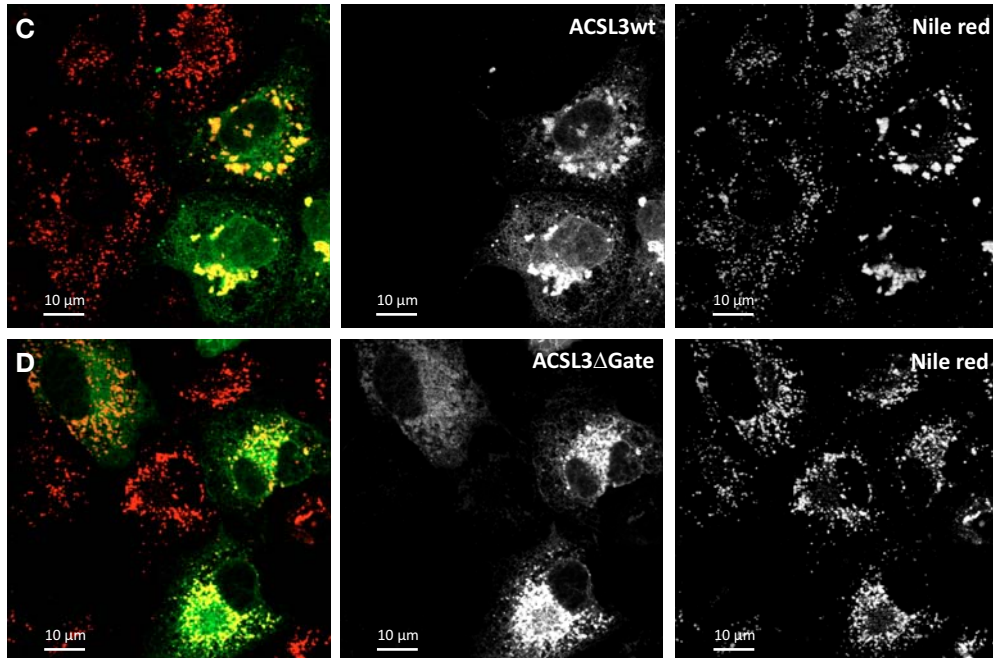
Estos resultados indican que la acumulación de CLs maduros, a tiempos largos de tratamiento con AO, depende de ACSL3, que también sería responsable de la mayoría de actividad ACSL en estas células, a pesar de que otras isoformas como ACSL4, también sensibles a triacsina C, se expresan más que ACSL3 (datos no mostrados). Además, mientras que la disminución de la expresión de ACSL3 en estas células reduce la cantidad de CLs (Figura 14A), la disminución de la expresión del resto de isoformas mediante siRNA no afecta la acumulación de CLs en respuesta a AO (datos no mostrados, [588] Anexo).

## 2.7 Contribución de la actividad de ACSL3 en la acumulación de CLs

El papel de ACSL3 en la biogénesis de los CLs podría ser debido a la actividad ACSL o a un posible papel estructural durante la acumulación de CLs. Para determinar la contribución específica de la actividad ACSL de ACSL3 en la acumulación de CLs, construimos una proteína ACSL3 sin actividad catalítica (Figura 15A). La delección del dominio *Gate* de ACSL3, homólogo al dominio *Gate* de ACSL6 [612] impide la actividad ACSL de esta proteína (Figura 15B). La sobreexpresión de la proteína mutada (ACSL3 $\Delta$ gate), al contrario de la de la forma *wt*, no incrementó la actividad ACSL de las células transfectadas (Figura 15B), demostrando que el dominio *Gate* es necesario para la actividad de ACSL3. En correlación con la actividad ACSL, la sobreexpresión de la forma *wt* de ACSL3 produce un claro incremento en la acumulación de CLs después de 16h de tratamiento con AO. Por otro lado, aunque en menor grado que la forma *wt*, la expresión de ACSL3 $\Delta$ gate también incrementa la cantidad de CLs (Figura 15C y D, cuantificado en E 16h),

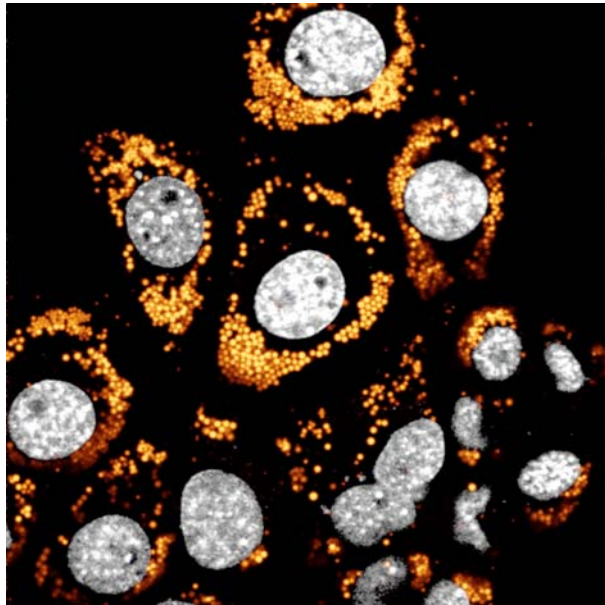
Posteriormente, el uso del mutante ACSL3 $\Delta$ gate en nuestro laboratorio ha permitido demostrar que, durante las primeras etapas de la biogénesis de CLs, la principal contribución de ACSL3 a la acumulación de CLs no es debida a su actividad, dado que la sobreexpresión de la forma *wt* y el mutante ACSL3 $\Delta$ gate incrementan la biogénesis de CLs de forma similar (Figura 15E, 45'). Por lo tanto, estos resultados sugieren que aunque la actividad de ACSL3 es muy importante para la acumulación de lípidos en los CLs a largo plazo, otras propiedades de esta enzima participarían durante la formación y acumulación de CLs. Además, confirmando la especificidad del efecto de ACSL3 sobre la acumulación de CLs, la sobreexpresión del resto de isoformas sensibles a triacsina C en nuestras células no afecta al contenido de CLs (Figura 15F y G). Por lo tanto ACSL3 sería la principal ACSL implicada en la acumulación de CLs en nuestro modelo.





**Figura 15. Contribución de la actividad ACSL en la acumulación de CLs.** (A) Obtención del péptido ACSL3Δgate por delección de los aminoácidos 314-339 (dominio gate) de ACSL3wt. (B) Ensayo de actividad ACSL en lisados de células COS-1 no transfectadas (control), o transfectadas con GFP-ACSL3 o GFP-ACSL3Δgate. En ausencia (control) o presencia de TRC 10μM. N=4. \*: p-valor<0,05 \*\*: p-valor<0,01; \*\*\*: p-valor<0,001. (C

y D) Células transfectadas con GFP-ACSL3 (C) o GFP-ACSL3Δgate (D), tratadas 16h con AO y teñidas con Nile red (CLs, canal rojo). (E) Cuantificación de CLs en células no-transfectadas, o transfectadas con GFP-ACSL3 o GFP-ACSL3Δgate, a los 45min y 16h de tratamiento con AO. (F y G) Cuantificación del contenido de CLs en células transfectadas con las diferentes isoformas de ACSL conjugadas a GFP y tratadas 30' (F) o 16h (G) con AO.

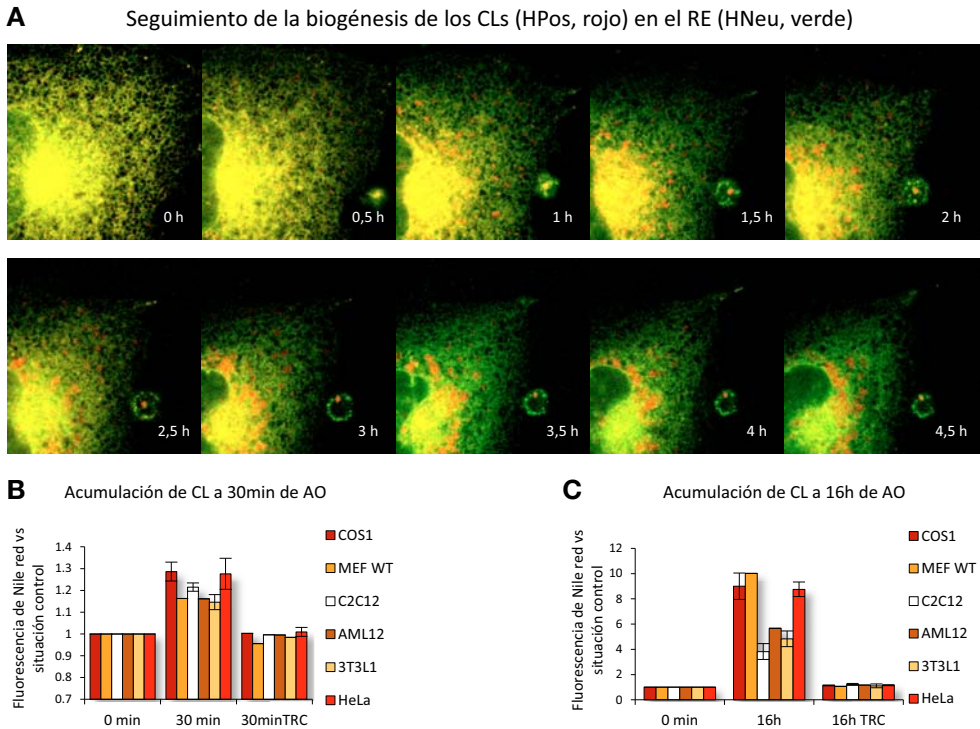


### ANÁLISIS DE LOS FACTORES QUE REGULAN LA ACUMULACIÓN DE CUERPOS LIPÍDICOS

En el apartado anterior hemos analizado el mecanismo de biogénesis de CLs que ocurre en el RE en respuesta a AO. Si se mantiene el aporte de ácidos grasos (AGs), los CLs se desplazan progresivamente desde su origen, mayoritariamente periférico, hacia el centro de la célula de forma coordinada con los túbulos del RE. Los CLs maduros de nueva formación se adhieren a otros CLs que realizan el mismo movimiento, formando primeramente agregados de 2-4 CLs que posteriormente irán incorporando otros CLs. Los agregados, cada vez mayores, finalmente llegan a zonas perinucleares donde se mantienen relativamente estáticos. (Video 1 en CD anexo y Figura 16A).

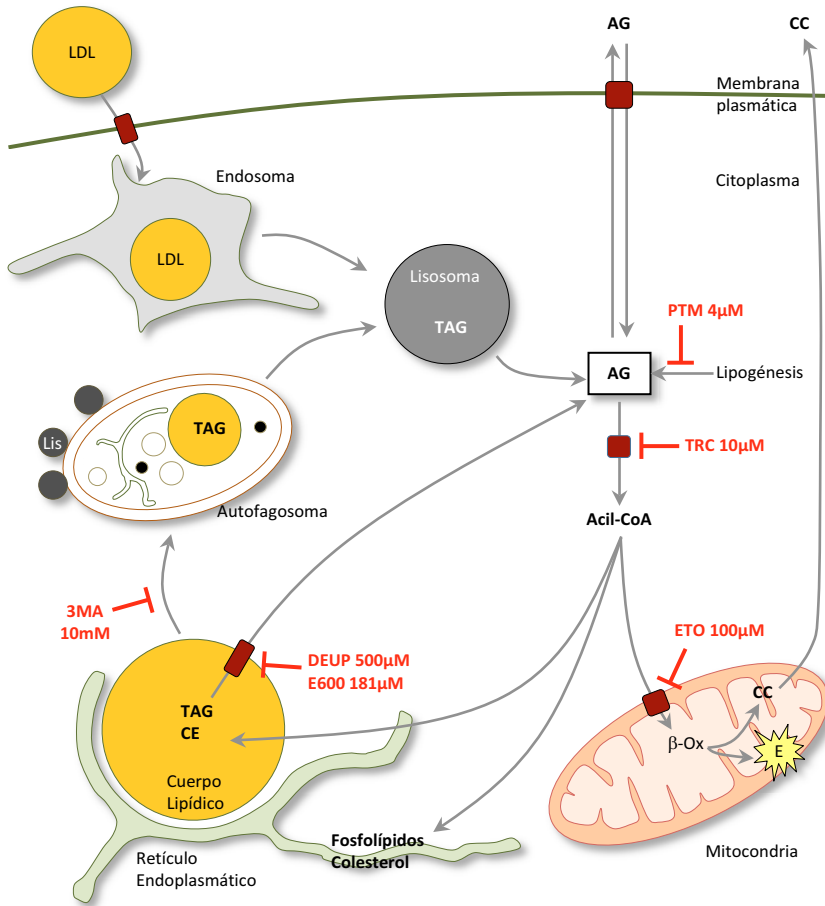
Para determinar la contribución del proceso de biogénesis en la acumulación final de CLs, se comparó la formación de estos orgánulos en respuesta a AO durante los primeros 30 minutos y al cabo de 16h, en diferentes líneas celulares. La especificidad de la acumulación de CLs se ha comprobado inhibiendo la actividad ACSL (imprescindible para formar CLs) con triacsina C. Sorprendentemente, la capacidad de formar CLs a tiempos cortos no correlaciona con la acumulación de CLs a tiempos largos de tratamiento en todas las líneas celulares (Figura 16B y C), sugiriendo que la acumulación de CLs no sólo estaría determinada por su formación sino también por otros factores independientes al proceso de biogénesis de estos orgánulos.

Con el objetivo de determinar estos factores, en esta parte del trabajo, analizamos la regulación de la acumulación de CLs por parte de distintas vías relacionadas con el metabolismo lipídico. Para ello, modificamos tanto las condiciones ambientales como factores intracelulares mediante inhibidores específicos de cada vía (detallados en el Esquema 1 de Resultados) durante el proceso de carga de CLs en respuesta a ácido oleico 175µg/ml (AO). Para este estudio seleccionamos tres líneas no transformadas de características metabólicas diferentes: una línea de fibroblastos (Vero), una de mioblastos (C2C12) y otra de hepatocitos (AML12) que han sido usadas previamente para estudiar el metabolismo lipídico y la dinámica de los CLs [300, 351, 613]. El contenido de CLs, teñidos con Nile red, fue cuantificado mediante citometría de flujo, en las diferentes situaciones indicadas.



**Figura 16. Análisis de la biogénesis de los CLs hasta llegar a la acumulación de CLs.**

(A) Seguimiento de la biogénesis de los CLs durante las primeras 4,5h de tratamiento con ácido oleico 175ug/ml (AO) en células COS-1. 24h antes de los tratamientos, las células se co-transfectaron con GFP-HNeu para resaltar el RE (canal verde) y OFP-HPos para resaltar los CL nacientes (canal rojo). (B y C) Contenido de CLs en las líneas celulares indicadas en situación control (0min) o tratadas 30min o 16h con AO. Para demostrar la especificidad de la medida de CLs se realizaron los mismos tratamientos con triacsina C 10 $\mu$ M (TRC). N=1-3.

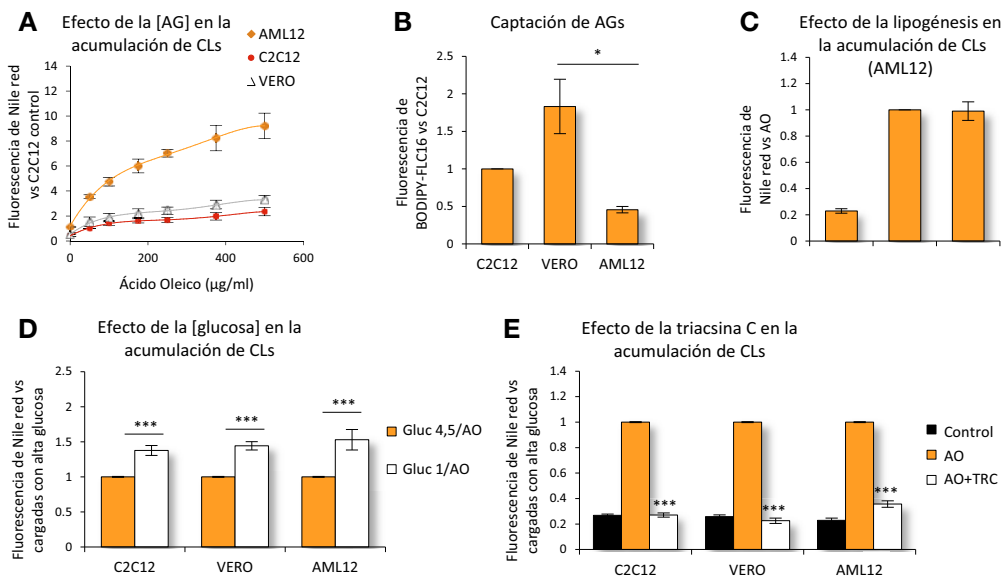


**Esquema 1. Metabolismo celular de los ácidos grasos.** Abreviaturas: LDL: Lipoproteínas de baja densidad; TAG: Triglicéridos; AG: Ácidos grasos; CC: Cuerpos cetónicos; CE: Ésteres de colesterol; Lis: Lisosomas;  $\beta$ -Ox: beta-oxidación de los ácidos grasos; E: Energía; PTM: platensimicina (inhibidor de la lipogénesis); TRC: triacsina C (inhibidor de la unión de coenzima A a los AGs); 3MA: 3-metiladenina (inhibidor de la autofagia); DEUP y E600 (inhibidores de la lipólisis); ETO: etomoxir (inhibidor de internalización de ácidos grasos en la mitocondria). En todos los experimentos de este bloque, los inhibidores de las diferentes vías se usan con las concentraciones aquí indicadas.



### 3.1 Factores que modulan la acumulación de CLs en distintos modelos celulares

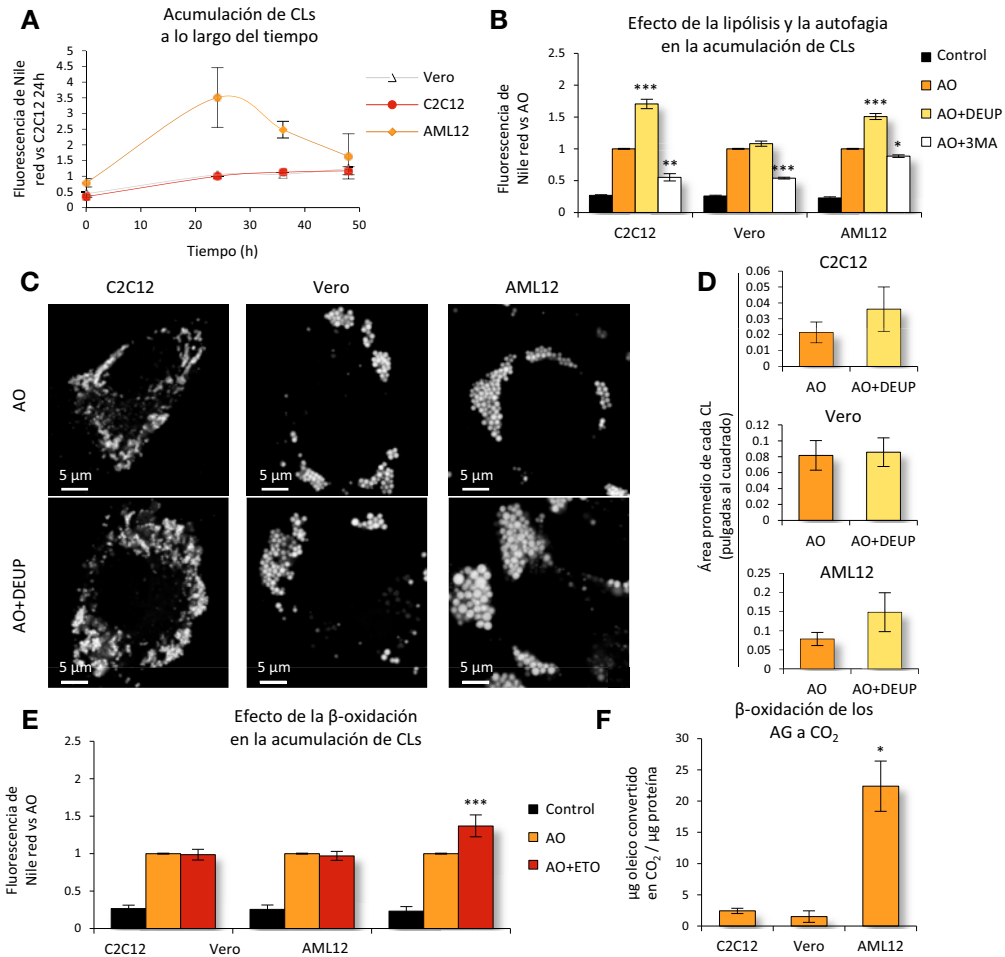
En estas 3 líneas celulares, el contenido de CLs es proporcional a la concentración de AO del medio, siendo las AML12 las que acumularon más CLs (Figura 17A). Sin embargo, este mayor contenido de CLs no correlaciona con una mayor capacidad de captación de AGs (Figura 17B) ni con una síntesis *de novo* de AGs significativa (inhibida con platensimicina, Figura 17C), aunque sí requiere de la actividad ACSL en los 3 modelos (inhibida con triacsina C, Figura 17E). Cabe destacar que la acumulación de CLs es mayor al reducir la concentración de glucosa en el medio (Figura 17D), aunque la captación de AGs no se ve modificada (datos no mostrados), sugiriendo otros mecanismos celulares para asegurar la presencia de nutrientes.



**Figura 17. Caracterización de la acumulación de CLs en células C2C12, Vero y AML12.**

(A) Contenido de CLs en células AML12, C2C12 y Vero tratadas 24h con AO. N=7. (B) Captación de AGs en las tres líneas. N=4. (C) Cuantificación de CLs en células AML12 tratadas 24h en medio control, con AO o con AO y PTM 4µM. N=2. (D) Contenido de CLs en las tres líneas celulares tratadas 24h con AO y un nivel de glucosa control (4,5g/l) o con AO y baja glucosa (1g/l). N=7. (E) Cuantificación de CLs en las tres líneas tratadas 24h en situación control, con AO o con AO y TRC 10µM. N=4-9. \*: p-valor<0,05; \*\*\*: p-valor<0.001.

Mientras que la acumulación de CLs es proporcional al tiempo de tratamiento en Vero y C2C12, en las células AML12 incrementa en las primeras 24h y posteriormente decrece (Figura 18A), sugiriendo una metabolización de los CLs más activa en estas últimas. Aunque se ha descrito que los CLs se metabolizan por autofagia (ver Introducción), la inhibición de la autofagia con 3-metiladenina disminuye la acumulación de CLs en las 3 líneas, indicando que en estas condiciones la autofagia participaría en mayor medida en la síntesis que en la degradación de este orgánulo (Figura 18B). Por otro lado, la inhibición de la lipólisis con DEUP aumentó tanto el contenido como el tamaño de los CLs en AML12 y C2C12, aunque no afectó en Vero (Figura 18B, C y D). Finalmente, la inhibición de la  $\beta$ -oxidación con etomoxir sólo incrementó el contenido de CLs en AML12, células con una  $\beta$ -oxidación muy superior a las otras dos líneas (Figura 18F y E).



**Figura 18. Caracterización de la acumulación de CLs en células C2C12, Vero y AML12.** (A) Seguimiento durante 48h de tratamiento con AO, de la acumulación de CLs en las tres líneas celulares. N=2. (B) Análisis de la inhibición de la lipólisis con DEUP 500 $\mu$ M o de la autofagia con 3MA 10mM en células tratadas durante 24h con AO. N=4-13. (C) Imágenes representativas de microscopía confocal in vivo de las tres líneas tratadas 24h con los tratamientos indicados y teñidas con Nile red. (D) Cuantificación del tamaño medio de los CLs en imágenes como las de C. N=1. (E) Análisis de la inhibición de la  $\beta$ -oxidación con ETO 100 $\mu$ M durante la acumulación de CLs en las tres líneas indicadas. N=9-13. (F)  $\beta$ -oxidación de AO- $^{14}$ C añadido durante las 3h últimas de una carga de 24h con AO. N=3.\*: p-valor<0,05; \*\*: p-valor<0,01; \*\*\*:p-valor<0,001.

El elevado metabolismo lipídico de esta línea, podría explicar el descenso en el contenido de CLs observado al incubarlas con AO durante 48h, que se revierte al inhibir la lipólisis (datos no mostrados).

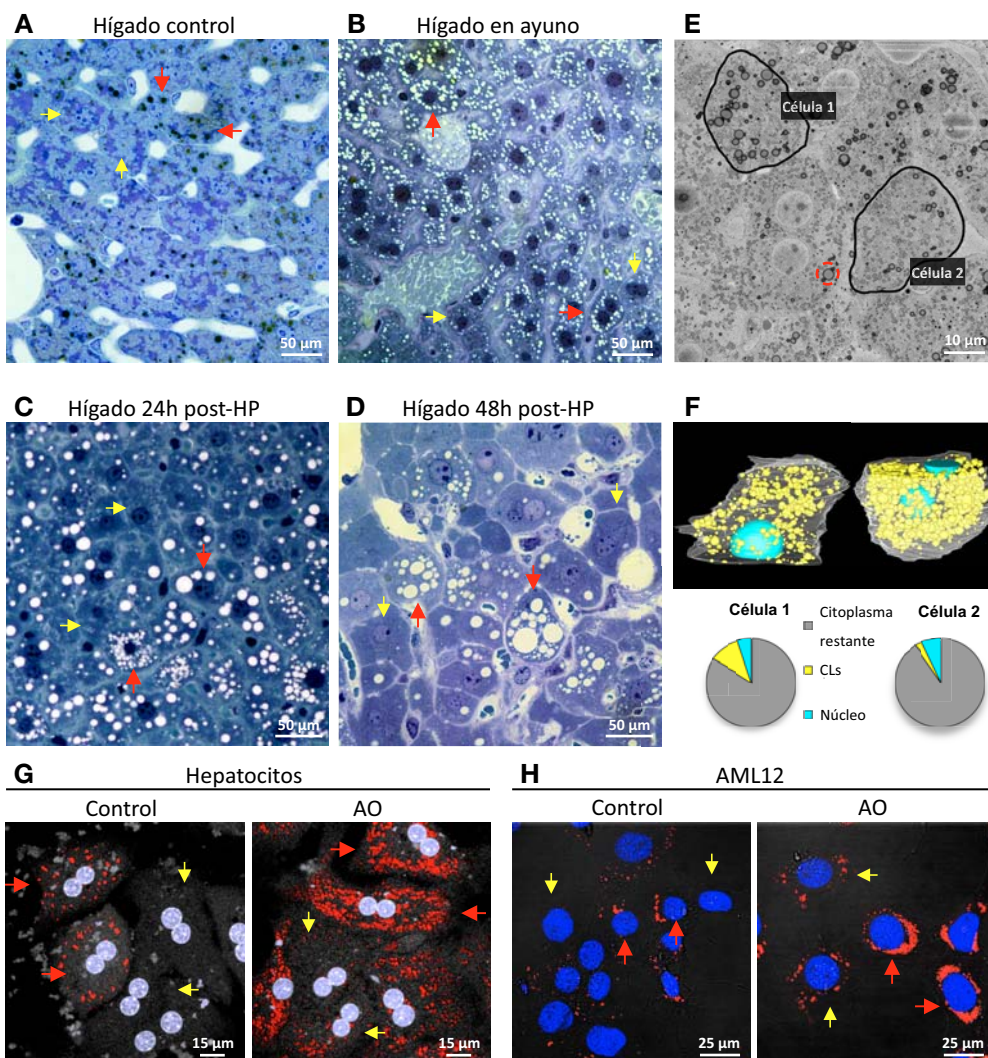
En conclusión, la acumulación de CLs en respuesta a AO viene regulada por el equilibrio entre los **factores que regulan la acumulación de lípidos neutros** (ambientales como la concentración de AG y glucosa o intracelulares como la autofagia y la actividad ACSL) y los **factores que regulan su metabolización** (lipólisis y  $\beta$ -oxidación basales). Los primeros actúan en el mismo sentido en los 3 modelos estudiados, mientras que la metabolización varía según el tipo celular. Así, en presencia de AO en el medio, en las células Vero no habría ni lipólisis ni  $\beta$ -oxidación de forma significativa, las C2C12 presentan una elevada lipólisis aunque no  $\beta$ -oxidación y finalmente las AML12 tendrían ambas vías activas, constituyendo el modelo estudiado con un metabolismo lipídico más complejo.

## 3.2 Heterogeneidad en la acumulación de CLs en el hígado

Durante el estudio de la acumulación de CLs en los diferentes modelos se observó una gran variabilidad en la acumulación de CLs entre células de un mismo cultivo, tratadas de manera idéntica, especialmente importante en el caso de las células AML12. La variabilidad intercelular en la acumulación de CLs se ha observado durante la diferenciación de adipocitos [614, 615], en células estrelladas de hígado [501], levadura [376], células tumorales [616] y en fibroblastos [117], y de forma relevante, en biopsias de hígados humanos [617], sin embargo, ha sido muy poco estudiada.

Inicialmente, quisimos comprobar la diferente acumulación de CLs entre células vecinas en el modelo hepático. Para ello, en colaboración con Anna Álvarez del grupo del Prof. Carles Enrich (Departament de Biologia cel·lular, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona), analizamos muestras de hígado de ratón. En situación control, donde la acumulación de CLs en hepatocitos es relativamente pequeña, observamos una alta variabilidad en el contenido de CLs entre hepatocitos próximos (Figura 19A). Esta variabilidad también se observa al promover la acumulación de CLs en los hepatocitos mediante el ayuno de nutrientes (Figura 19B) o durante la regeneración hepática tras una hepatectomía parcial [618] (Figura 19C y D). En estas condiciones, la mayoría de hepatocitos acumulan CLs, pero, asimismo, hay grandes diferencias en el contenido y tamaño de los CLs entre hepatocitos vecinos, siendo máximas a las 48h después de la hepatectomía parcial.

Para caracterizar con más detalle la acumulación heterogénea de CLs en el hígado, en colaboración con Nicholas Ariotti del laboratorio del Prof. Robert G. Parton (IMB, Universidad de Queensland, Australia), analizamos muestras de hígado control mediante *serial-block-face scanning electron microscopy*. Esta técnica permite realizar imágenes de 1000 planos consecutivos de microscopía electrónica de una sección de aproximadamente 50µm de grosor y hacer la reconstrucción tridimensional (Video 2 en CD anexo, y plano representativo en Figura 19E). Los CLs se distinguen claramente por su electrodensidad (para ejemplo ver círculo rojo en la Figura 19E). Mediante esta técnica volvimos a observar una elevada heterogeneidad en la acumulación de CLs. Para demostrar que la variabilidad observada en un corte de hígado no se debe a la disposición de los CLs en dife-



**Figura 19. Heterogeneidad en la acumulación de CLs en el hígado.** (A-D) Imágenes representativas de cortes de hígado de ratón control (A), en situación de ayuno (B) y 24h (C) y 48h (D) después de una hepatectomía parcial (HP), teñidos con azul de metileno. Los CLs aparecen como estructuras redondas oscuras en el hígado control o blancas en el resto de imágenes. (E y F) Microscopía electrónica en 3D de hígado control. Plano representativo mostrando dos células seleccionadas (E) y análisis de segmentación de ambas células (F). (G y H) Cultivo primario de hepatocitos de ratón (G) o células AML12 (H) en medio control (paneles izquierdos) o 24h con ácido oleico (50ug/ml para hepatocitos y 175μg/ml para AML12) (paneles derechos) teñidos con Nile red (CLs, rojo) y Hoechst (núcleos, azul). Las flechas rojas y amarillas señalan células con alto o bajo contenido de CLs respectivamente.

rentes planos, se escogieron dos células como ejemplo y se seleccionó el área de CLs, núcleo y citoplasma en cada sección, permitiendo realizar la reconstrucción en tres dimensiones y analizar el volumen total de CLs respecto al citoplasma (Videos 3 y 4 en CD anexo). La reconstrucción tridimensional muestra grandes diferencias, siendo el 10,9% de citoplasma ocupado por CLs en la célula 1 mientras que sólo el 2,6% en la célula 2 (Figura 19F).

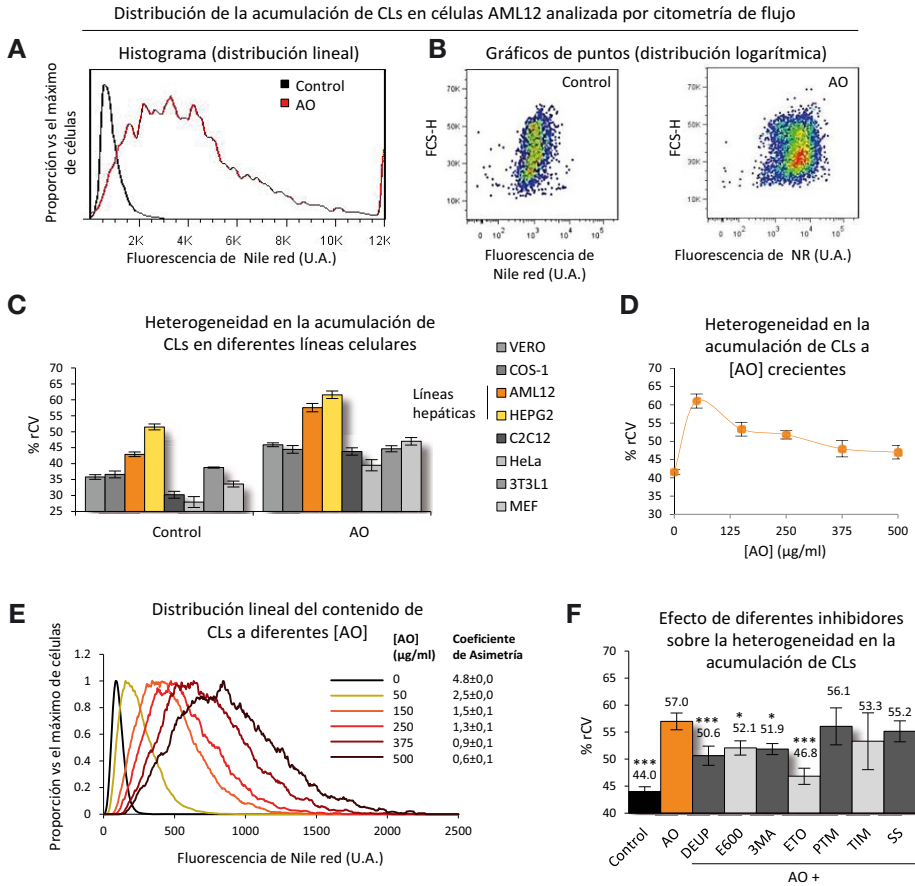
La heterogeneidad observada tampoco es debida exclusivamente a la diferente distancia de cada hepatocito con respecto a los vasos sanguíneos, dado que también se observa en hepatocitos aislados tanto en situación control como al ser tratados 24h con AO (Figura 19G), al igual que en células AML12 (Figura 19H). Por lo tanto, la heterogeneidad en la acumulación de CLs sería una característica intrínseca de las células hepáticas y no tan solo una mera consecuencia de la arquitectura del hígado.

### 3.2.1 Análisis de la heterogeneidad en la acumulación de CLs

Para analizar esta variabilidad usamos el análisis por citometría de flujo de células teñidas con Nile red (ver Material y métodos), puesto que dicha técnica nos permitía el análisis de la acumulación de CLs célula a célula y de forma más cuantitativa que por microscopía de fluorescencia, analizando 10.000 células por condición en cada experimento.

La representación de la distribución del contenido de CLs en células AML12, tanto mediante histogramas (Figura 20A) como por diagramas de puntos (Figura 20B), muestra una elevada heterogeneidad, que incrementa con el tratamiento de AO (Figura 20A y B). Además, la asimetría del histograma que representa la distribución del contenido de CLs, sugiere la existencia de una subpoblación de células con un alto contenido en CLs respecto a la media de la población. De esta manera, al tratarlas con AO, no todas las células acumulan CLs de la misma forma. Como medida cuantitativa de la heterogeneidad observada, usamos el % **robust coefficient of variance** (%rCV) (ver Material y métodos) que nos indica la desviación media de una célula respecto a la mediana de la población, y que no se afecta por valores individuales muy alejados de ésta. Por lo tanto, el %rCV mide la heterogeneidad poblacional del parámetro estimado, en nuestro caso, el contenido de CLs medido por la fluorescencia del Nile red de cada célula. El





**Figura 20. Factores que afectan la heterogeneidad en la acumulación de CLs en AML12.** (A y B) Histograma (escala lineal, A) y gráficos de puntos (escala logarítmica, B) representativos de la fluorescencia de Nile red (cantidad de CLs), medida por citometría de flujo, de células AML12 control y tratadas 24h con AO. (C) Heterogeneidad en la acumulación de CL (%rCV de la distribución de la tinción de Nile red) en diferentes líneas celulares en situación control y AO como en A. N=2-3. (D) %rCV de la acumulación de CLs en células AML12 tratadas 24h con concentraciones crecientes de AO. N=3. (E) Distribución lineal promedio del contenido de CLs en células AML12 tratadas durante 24h con concentraciones crecientes de AO y coeficiente de asimetría de estas distribuciones. Cada coeficiente es significativamente diferente de el de la posterior [AO]. N=3. (F) %rCV de la acumulación de CLs en células AML12 control y tratadas 24h con AO y los inhibidores indicados. TIM: timidina. SS: Sin suero. N=2 (PTM y SS); N=4-13 (Resto). Significación calculada respecto al tratamiento AO. \*: p-valor<0,05; \*\*\*: p-valor<0,001.

%rCV de la acumulación de CLs también incrementa significativamente al tratar las células con AGs ( $44.0 \pm 0.9\%$  en no tratadas y  $57.0 \pm 1.6\%$  en tratadas con AO, Figura 20F) reflejando lo observado en los histogramas y siendo superior al %rCV de otros procesos como la endocitosis de fase fluida (con un %rCV= $40.7 \pm 1.3$ ).

Mediante este sistema, analizando diferentes líneas celulares se observó que la heterogeneidad era mayor en aquellas de origen hepático (AML12 y HepG2) (Figura 20C). Así, posiblemente, las células hepáticas posean mecanismos específicos para controlar dicha heterogeneidad. A partir de este punto, pasamos a estudiar la heterogeneidad en la acumulación de CLs exclusivamente en hepatocitos, concretamente en células AML12.

Con el objetivo de determinar los factores que controlan la heterogeneidad en la acumulación de CLs en estas células, estudiamos como afectaban al %rCV los factores ambientales (concentración de AGs) e intracelulares (lipólisis,  $\beta$ -oxidación, autofagia o lipogénesis) durante la carga y la descarga de CLs.

### **3.2.2 Factores que afectan a la heterogeneidad en el contenido de CLs durante la carga de CLs**

Inicialmente, descartamos que tal heterogeneidad reflejara la presencia en el cultivo de células en diferentes etapas del ciclo celular. La sincronización de éstas tanto en fase G1 como en fase S no afectó a la heterogeneidad en el contenido de CLs (Figura 20F, y perfiles de ciclo en Material y métodos), a pesar de observarse un incremento en el contenido de CLs medio de la población al progresar en el ciclo celular (datos no mostrados).

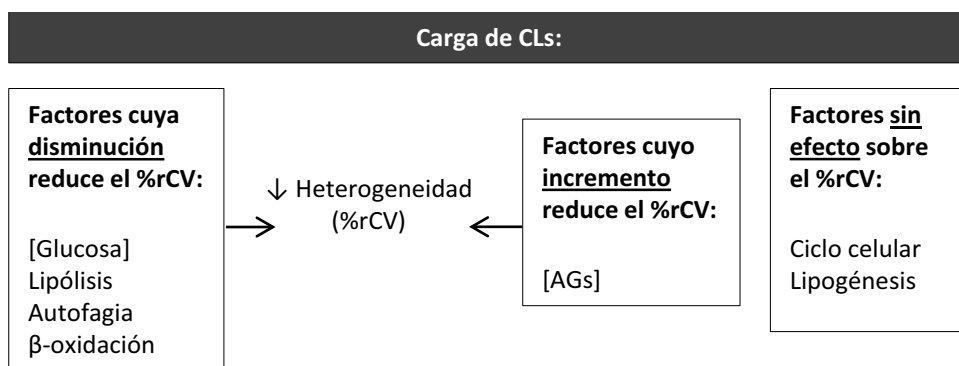
Seguidamente, analizamos la afectación de la heterogeneidad por factores ambientales como la disponibilidad de sustratos. Sorprendentemente, el incremento de la concentración de AO, aunque incrementa la acumulación de CLs, disminuye la heterogeneidad en dicha acumulación (Figura 20D, %rCV) y también la asimetría de su distribución (Figura 20E, coeficiente de asimetría). Este hecho se podría explicar por la elevada heterogeneidad observada en la captación de AGs (%rCV= $52.5 \pm 2.2$ ). A concentraciones bajas de AG, sólo aquellas células con mayor afinidad por éstos podrán captarlos, mientras que a concentraciones altas, el sistema se saturaría. La reducción de la concentración de glucosa de 4,5g/l a 0,1g/l disminuye la heterogeneidad pasando de un %rCV de  $57.0 \pm 1.6\%$



a  $48.1 \pm 1.9\%$ .

A continuación, analizamos la participación de las diferentes vías metabólicas, mediante los diferentes inhibidores (Esquema 1), sobre la heterogeneidad en la acumulación de CLs. La inhibición de la lipólisis (DEUP y E600), la autofagia (3MA) y la  $\beta$ -oxidación (etomoxir) disminuye el %rCV (Figura 20F). Por lo tanto, la diferente actividad de estas vías implicadas en el metabolismo lipídico también contribuye a la heterogeneidad en el contenido de CLs. Por otro lado, la síntesis *de novo* de AGs (PTM) diferencial no generaría diferencias intercelulares en el contenido de CLs.

Como conclusión, los factores más determinantes de la heterogeneidad entre células durante la carga de CLs en respuesta a AGs se resumen en el Esquema 2.



Esquema 2. Factores que afectan la heterogeneidad en la acumulación de CLs en AML12.

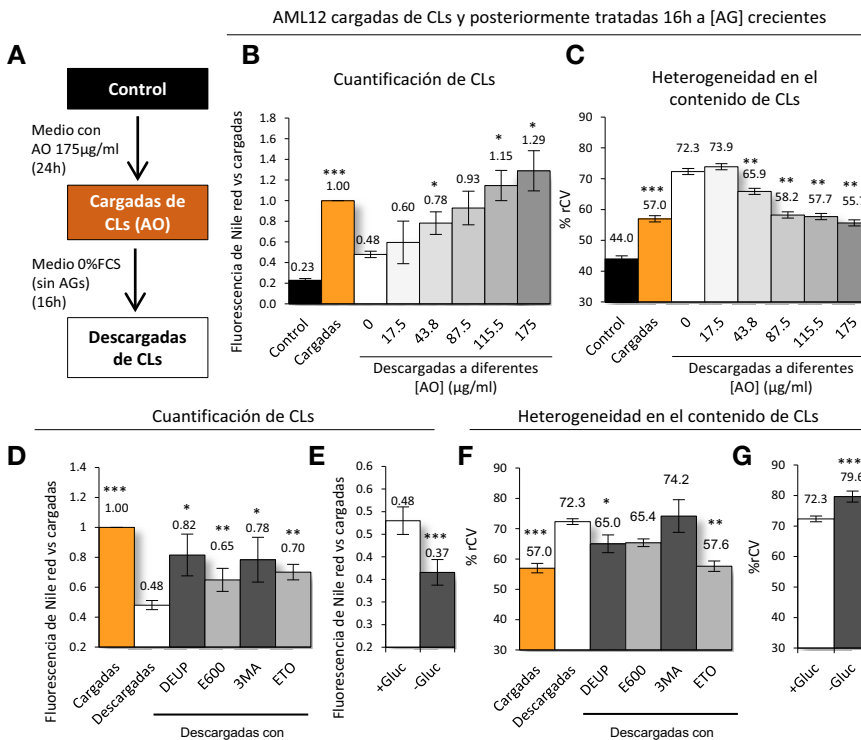
### 3.2.3 Factores que afectan a la heterogeneidad en el contenido de CLs durante su metabolización.

Puesto que las vías que controlan la metabolización de los CLs son importantes en la regulación de la heterogeneidad en el contenido de CLs, y que los CLs se metabolizan al eliminan los lípidos del medio durante 16h ([115], **descarga de CLs**) (Figura 6A), analizamos el comportamiento de la heterogeneidad en esta situación y los factores que la regulan.

Como era de esperar, en situación de descarga de CLs (sin suero ni AGs añadidos) las células consumen los CLs (Figura 21B barras blancas en comparación

con las naranjas), pero curiosamente, la heterogeneidad incrementa de forma muy importante (Figura 21C barras blancas en comparación con las naranjas). Resultados similares se observaron al tratar las células en medio con suero delipidoado (datos no mostrados). Además, este incremento es reversible mediante el tratamiento de las células con AO incluso a concentraciones mucho menores a las usadas en el proceso de carga (Figura 21B y C).

En estas condiciones, el contenido de los CLs se metaboliza tanto por lipólisis (DEUP y E600) como por autofagia (3MA) y  $\beta$ -oxidación (etomoxir), puesto que su



**Figura 21. Factores que afectan la heterogeneidad durante la descarga de CLs.** (A) Esquema de los tratamientos realizados. Células AML12 han sido mantenidas en medio control (Control, barras negras) o cargadas de CLs con un tratamiento de 24h con AO (Cargadas, barras naranjas). Posteriormente han sido tratadas 16h en medio sin suero ni AGs añadidos y [glucosa] (4,5g/l) (Descargadas, barras blancas). Sobre el medio de descarga se han hecho variaciones, añadiendo AO, determinados inhibidores o sacando la glucosa. (B y C) Cuantificación de los CLs (B) y de la heterogeneidad en su acumulación (C) en células cargadas de CLs y descargadas con concentraciones crecientes de AO. N=3-4. (D y F) Cuantificación de los CLs (D) y de la heterogeneidad en su acumulación (F) en

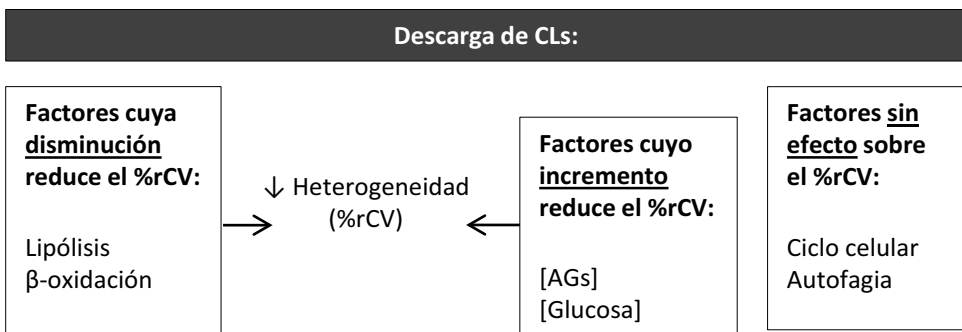
células cargadas de CLs y tratadas en medio de descarga con los inhibidores indicados. N=2 (E600); N=5-8 (Resto). (E y G) Cuantificación de los CLs (E) y de la heterogeneidad en su acumulación (D) en células cargadas de CLs y tratadas en medio de descarga con o sin glucosa. N=17. Significaciones siempre calculadas respecto a las barras blancas. \*: p-valor<0,05; \*\*: p-valor<0,01; \*\*\*:p-valor<0,001.

inhibición incrementa el contenido de CLs (Figura 21D). Sin embargo, entre éstas, tan solo la inhibición de la lipólisis y la  $\beta$ -oxidación afectan al %rCV (Figura 21F), indicando que a autofagia no contribuye a las diferencias en la cantidad de CLs entre células en estas condiciones.

De acuerdo con una estimulación del catabolismo de CLs, la depleción de glucosa durante la descarga acelera el consumo de CLs (Figura 21E) e incrementa la heterogeneidad en el contenido de éstos (Figura 21G).

Del mismo modo que en situación de carga de CLs, la inhibición del ciclo celular mediante el tratamiento con timidina no afecta significativamente a la heterogeneidad en el contenido de éstos durante el proceso de descarga (datos no mostrados).

Para concluir, durante el proceso de descarga de CLs las células metabolizan estos orgánulos de forma muy heterogénea, y los factores que determinan esta heterogeneidad se resumen en el Esquema 3.



**Esquema 3. Factores que afectan la heterogeneidad durante la descarga de cuerpos lipídicos.**

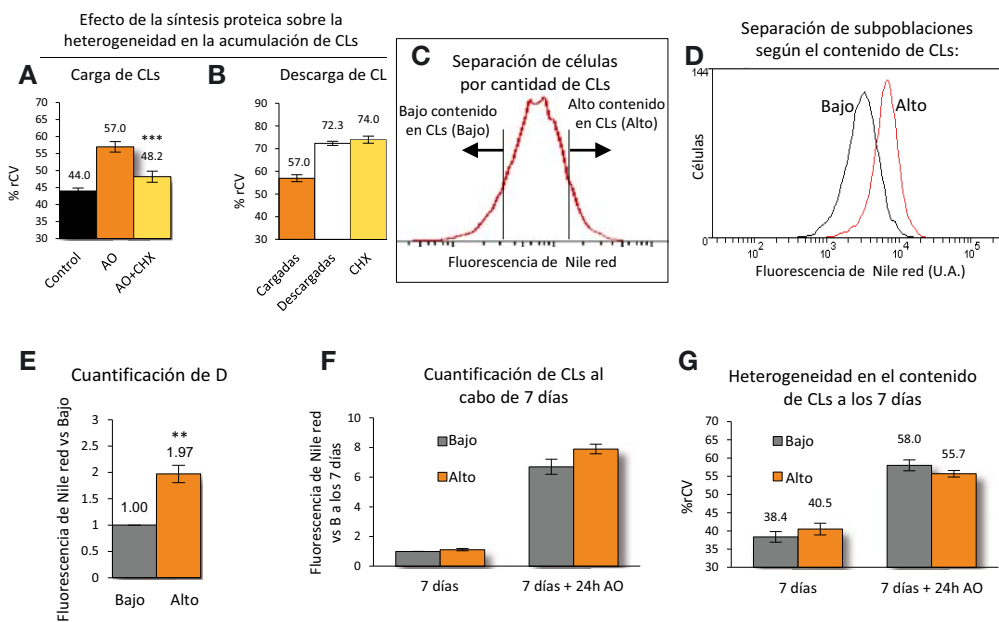
### 3.2.4 La heterogeneidad en la acumulación de CLs es un proceso estocástico

Las diferentes respuestas observadas al estudiar células idénticas ante un mismo estímulo, o una misma célula ante el mismo estímulo pero en distintos momentos suelen deberse a la estocástica de la expresión génica, que refleja fluctuaciones de la transcripción y/o traducción de genes y proteínas [619].

Si la heterogeneidad en el contenido de CLs es debida a diferencias en la síntesis proteica entre células de un mismo cultivo, la inhibición de ésta debería reducir dichas diferencias y consecuentemente la heterogeneidad. El tratamiento con ciclohexemida disminuyó drásticamente el %rCV durante el proceso de carga pero no tuvo efecto durante la descarga (Figura 22A y B). La inhibición de la síntesis proteica sólo afectó de forma leve al contenido medio de CLs en ambos procesos (datos no mostrados). Así, probablemente la estocástica en la síntesis de proteínas en respuesta a los AGs determina qué células dentro de un mismo cultivo acumularán más CLs, y cuáles los metabolizarán más rápido en un posterior ayuno de lípidos.

La estocástica en los procesos biológicos permite la adaptación de la población a entornos cambiantes sin la necesidad de mutaciones irreversibles [620], y por lo tanto es un proceso reversible. Del mismo modo, si la heterogeneidad en la acumulación de CLs está determinada por la estocástica en la expresión génica, debería ser reversible. Para analizar esta reversibilidad se separaron mediante citometría de flujo (*cell sorting*) el 15% de células con mayor y menor contenido de CLs dentro de una misma población cargada con AO (Figura 22C). Así, se obtuvieron dos subpoblaciones con diferente contenido de CLs procedentes de la misma población original (Figura 22D y E). El cultivo por separado de estas subpoblaciones en medio control durante una semana provoca la esperable reducción en el contenido de CLs hasta niveles basales, quedando ambas subpoblaciones completamente descargadas y con baja heterogeneidad (Figura 22F y G, barras de la izquierda). De forma importante, el tratamiento de nuevo durante 24h con AO promueve la acumulación de la misma cantidad de CLs en ambas subpoblaciones (Figura 22F, barras de la derecha) y en ambos casos con similar %rCV (Figura 22G, barras de la derecha), muy parecido al de la población inicial (Figura 22A, barra roja).

Así, la heterogeneidad en la acumulación de CLs dependería de la estocástica de la expresión génica de proteínas probablemente implicadas en las vías metabólicas que regulan este proceso (posiblemente algunas de las definidas en el apartado anterior), y como se espera en los procesos estocásticos, es reversible a lo largo del tiempo.

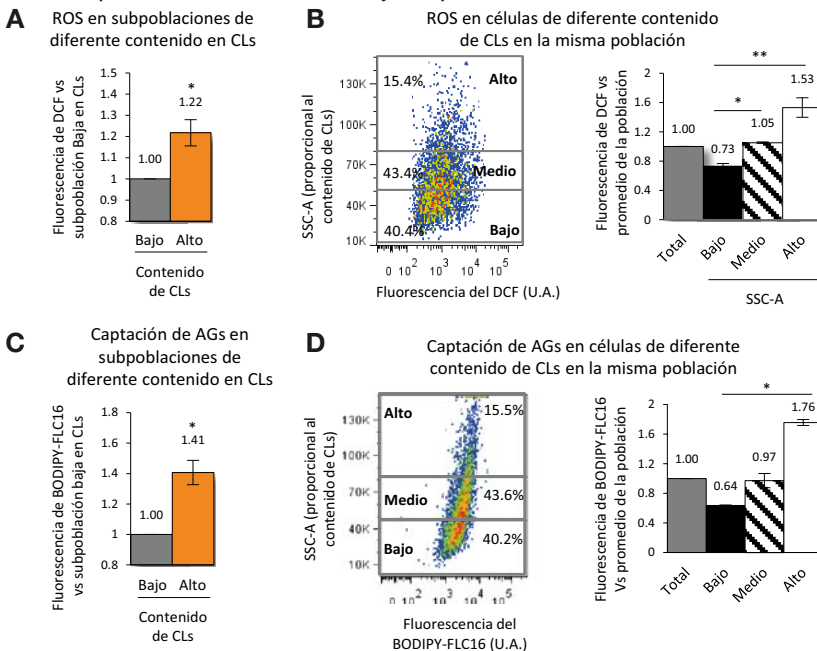


**Figura 22. La heterogeneidad en la acumulación de CLs depende de síntesis proteica y es reversible.** (A y B) Efecto del tratamiento con CHX 10µg/ml sobre la heterogeneidad en el contenido de CLs durante la carga de CL en respuesta a AO (A) o durante la descarga de CLs en medio sin AGs (B). N=4-13 Significación calculada respecto a AO. \*\*\*: p-valor<0,001. (C-E) Separación celular por *cell sorting* de subpoblaciones con mayor (Alto) y menor (Bajo) contenido de CL. (C) Esquema del proceso. (D y E) Histograma representativo (C) y cuantificación (E) del contenido de CLs de las subpoblaciones acabadas de separar. N=6. \*\*: p-valor<0,01. (F y G) Cuantificación del contenido de CLs (F) y heterogeneidad (G) en las subpoblaciones Alto y Bajo cultivadas separadamente 7 días o adicionalmente tratadas 24h con AO. N=3.

### 3.2.5 La subpoblación de células con alto contenido en CLs es una ventaja para la población

Hasta ahora hemos visto que al tratar con AO células AML12 se genera una subpoblación que acumula una mayor cantidad de CLs. Dado que los AGs generan lipotoxicidad en las células y que la lipotoxicidad conlleva un incremento en el estrés oxidativo en éstas (ver Introducción) nos preguntamos si esa subpoblación sufriría más estrés oxidativo.

Para testar esta hipótesis, separamos las células más cargadas de CLs y las menos cargadas dentro de una misma población, como en el apartado anterior, mediante citometría de flujo (*cell sorting*). Inmediatamente después de ser separadas, las células con más CLs muestran una mayor acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*) (Figura 23A). Además, en una población no separada de células cargadas con CLs, el contenido de CLs y la cantidad de estrés oxidativo correlacionan, de manera que el 15% de células con más CLs acumula un 53% más de ROS que la media de la población, permitiendo al 40% de células con menor contenido de CLs tener un nivel de ROS inferior a la media (Figura 23B) y similar al de una población no tratada con AGs (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que la compartimentación del contenido de CLs en una subpoblación podría reducir el estrés oxidativo a la mayoría de células de la población, siendo ventajoso para ésta.

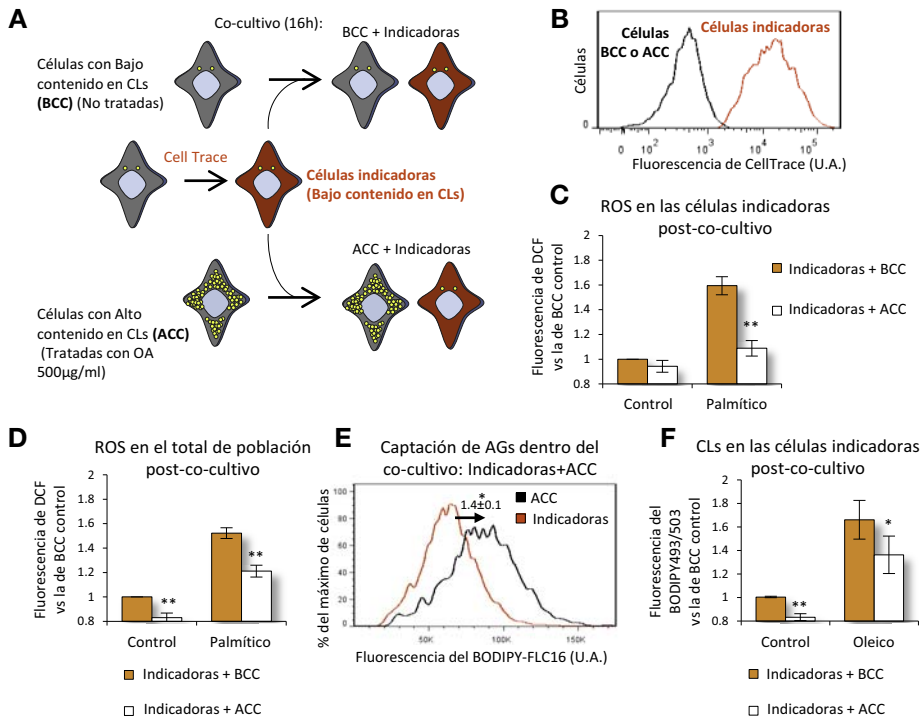


**Figura 23. Las células con mayor contenido de CLs en una población tienen más ROS y captan más AGs.** (A y C) Separación celular según el contenido de CLs como en la Figura 22. (A) Niveles de estrés oxidativo (ROS) y (C) análisis de la captación de AGs en subpoblaciones con mayor (Alto) y menor (Bajo) contenido de CLs, inmediatamente después de ser separadas. N=4 y N=3 respectivamente. (B y D) Correlación entre el contenido de CLs (analizado con el SSC-A) y el nivel de estrés oxidativo (B) o la captación de AGs (D) en células AML12 tratadas con AO. Se han seleccionado 3 subpoblaciones con Alto (16% de células), Medio (44% de células) y Bajo (40% de células) valor de SSC-A y se ha analizado el nivel de estrés oxidativo (B) o la captación de AGs (D) de cada subpoblación. N=3 y N=2 respectivamente. \*: p-valor<0,05; \*\*: p-valor<0,01.

Para analizar esta posibilidad, generamos una población de células con bajo contenido en CLs (células control sin tratar con AO) que marcamos de forma covalente con una tinción fluorescente (CellTrace DDAO-SE) para su seguimiento a lo largo del experimento. Llamaremos a estas células: **células indicadoras**. Las células indicadoras fueron mezcladas 1:1 con células con bajo contenido en CLs (**BCC**, células control no teñidas) o con células con muy alto contenido en CLs (**ACC**, células previamente tratadas durante 24h con una concentración elevada de AO, 500µg/ml y no teñidas) (Esquema en Figura 24A). Seguidamente, las dos poblaciones mixtas fueron cultivadas durante 16h en medio control o en medio con ácido palmítico, un AG muy lipotóxico (ver Introducción). El análisis mediante citometría de flujo nos permite analizar por separado las células indicadoras dentro de cada una de las poblaciones mixtas (Figura 24B).

Estos experimentos revelaron que, en respuesta a ácido palmítico, las células indicadoras (de bajo contenido de CLs) generan más estrés oxidativo al ser co-cultivadas con células con bajo contenido en lípidos (BCC) que al ser co-cultivadas con células con alto contenido de CLs (ACC) (Figura 24C), indicando que la presencia de células con gran contenido de CLs protege a las células con menos CLs de la lipotoxicidad.

Además, las poblaciones que contienen una subpoblación de células ACC muestran un menor estrés oxidativo promedio respecto a las poblaciones en que todas las células tienen menor número de CLs, tanto en situación control como tras tratarlas con ácido palmítico (Figura 24D). Así, la presencia de una subpoblación de células con alto contenido en CLs no sólo protege la subpoblación con menor contenido, sino que además permite a toda la población en su conjunto tener menos estrés oxidativo, siendo una ventaja poblacional. En base a estos resultados postulamos que las células con alto contenido en CLs activarían algunos mecanismos para reducir su estrés oxidativo.



**Figura 24. La presencia de una subpoblación celular de mayor contenido en CLs es una ventaja para la población.** (A) Esquema de los experimentos de co-cultivo realizados en esta figura. Células control (de bajo contenido en CLs) han sido marcadas covalentemente con CellTrace DDAO-SE para poderlas seguir en los sucesivos experimentos (células indicadoras). Las células indicadoras han sido mezcladas (1:1) con células control no teñidas (BCC, de bajo contenido en CLs) o con células tratadas 24h con AO 500µg/ml (ACC, con alto contenido en CLs) y co-cultivadas en los medios indicados durante 16h. (B) Histograma representativo de una población mixta mostrando la fluorescencia del CellTrace DDAO-SE. (C y D) Niveles de estrés oxidativo (ROS) en las células indicadoras (C) o en el total de la población (D), de cada población mixta cultivada en medio control o con ácido palmítico 50µg/ml. N=4. (E) Captación de AG en el co-cultivo formado por células ACC e Indicadoras después del tratamiento de 16h en medio control. N=3. (F) Análisis del contenido de CLs mediante tinción con BODIPY 493/503 en las células indicadoras de cada co-cultivo en medio control o con AO 50µg/ml. N=3. \*: p-valor<0,05; \*\*: p-valor<0,01.



### **3.2.6 Las células con mayor contenido en CLs captan más AGs y reducen la acumulación de CLs en el resto de células**

El efecto protector de las células ACC podría deberse a un mayor secuestro de los AGs del medio por parte de éstas reduciendo la exposición a AGs de las células con menor contenido de CLs. Apuntando en esta dirección, las células con mayor contenido de CLs, al cabo de 24h de tratamiento con AO, muestran una mayor capacidad de captación de AGs (Figura 23C en células separadas de la misma población y 23D para la correlación entre captación de AGs y contenido de CLs en una población no separada). Además, después del cocultivo de 16h con células indicadoras (bajo contenido en lípidos), las células ACC (alto contenido en lípidos) siguen captando más AGs (Figura 24E). En correlación con estos resultados, la acumulación de CLs en las células indicadoras se reduce al ser cocultivadas con células ACC respecto al cocultivo con células BCC (bajo contenido en lípidos), tanto en situación control como al ser tratadas con AO durante las 16h de cocultivo (Figura 24F).

Como conclusión, la presencia de una subpoblación de células con alto contenido en CLs reduce la acumulación de éstos en las células vecinas de menor contenido en CLs, probablemente debido a su mayor capacidad de captación de AGs. Esta mayor capacidad de captación de AGs podría actuar como mecanismo de retroalimentación positiva permitiendo a esta subpoblación acumular cada vez más CLs, separándose del resto.

### **3.2.7 Las células con más CLs pueden aportar AGs al resto de la población**

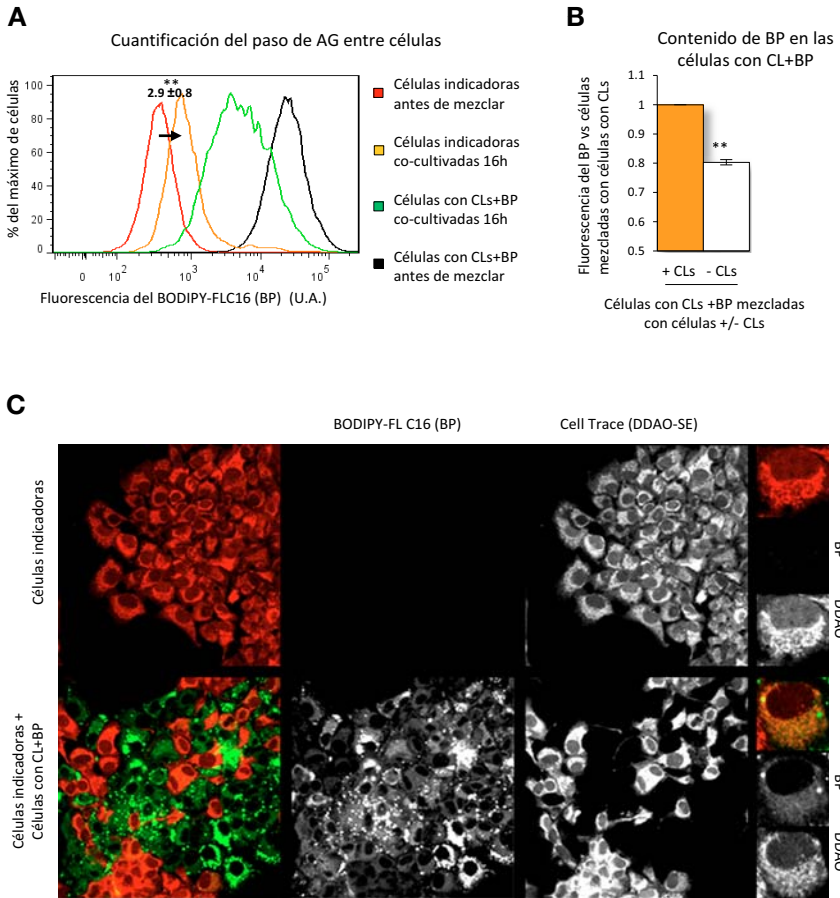
La existencia de células especializadas en la acumulación de grasas está conservada a lo largo de la evolución. En colaboración con la Dra. Maria Isabel Geli (IBMB, CSIC), hemos confirmado mediante citometría de flujo, la presencia de una elevada heterogeneidad en la acumulación de CLs en *S. cerevisiae* (datos no mostrados y [376]). La compartimentación de la acumulación de grasas en diferentes células tiene varias funciones, una de ellas es proteger el sistema frente a la lipotoxicidad, dado que en situaciones donde la compartimentación se ve afectada, como en determinadas lipodistrofias humanas, se observa lipotoxicidad en tejidos no adiposos (ver Introducción). En el apartado anterior hemos postulado

la capacidad protectora frente a la lipotoxicidad de la compartimentación de los CLs en una subpoblación dentro del mismo cultivo de células hepáticas.

Otra función importante de la compartimentación de grasas es la capacidad de las células especializadas en la acumulación de AGs de suministrarlos al resto de células cuando éstas los necesitan, como se da en situación de ayuno en el tejido adiposo. Para analizar si dentro de un cultivo de células AML12 aquellas que acumulan más CLs también ejercen esta función, se generó una población de células cargadas de CLs a las que se incorporó un AG fluorescente (BODIPY-FLC16) durante el proceso de carga quedando la mayoría de BODIPY-FLC16 acumulado en sus CLs (ver Material y métodos). Esta población de células fue cocultivada durante 16h en medio control (sin AGs añadidos) con células indicadoras como las usadas en el apartado anterior (células control, de bajo contenido en CLs y teñidas con DDAO-SE) y se analizó la cantidad de BODIPY-FLC16 captado por estas últimas al final del cocultivo.

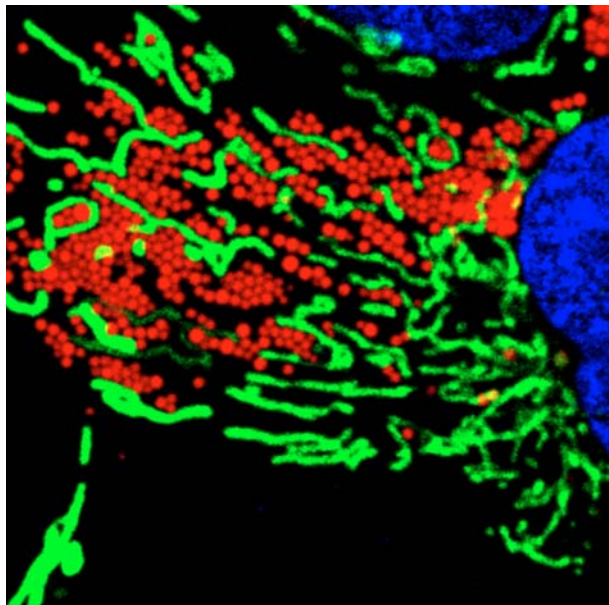
Tanto por citometría de flujo (Figura 25A línea naranja vs línea roja) como mediante microscopía (Figura 25C) se observa que, en estas condiciones, las células indicadoras captan BODIPY-FLC16 procedente de las células de alto contenido en CLs. Además, las células cargadas de CLs ven reducido su contenido en este AG (Figura 25A línea verde vs línea negra), como es esperable en condiciones de descarga de CLs. Curiosamente, dicha reducción es mayor cuando son mezcladas con células de bajo contenido en CLs que al ser cocultivadas con células cargadas de CLs (Figura 25B).

Así, estos resultados sugieren un intercambio activo de lípidos desde subpoblaciones con mayor contenido de CLs hacia subpoblaciones de menor contenido.



**Figura 25. Las células con más CLs pueden aportar AGs a las células con menos CLs.** (A) Células con BODIPY-FLC16 (BP) acumulado en los CLs (CLs+BP, ver Material y métodos), posteriormente mezcladas con células indicadoras como las de la Figura 24 (control, sin CLs, conjugadas con CellTrace DDAO-SE) y co-cultivadas 16h en medio control. Histogramas representativos de la fluorescencia del BP en células indicadoras y células CLs+BP antes y después del co-cultivo. También se muestra el promedio del incremento de fluorescencia en las células indicadoras durante el co-cultivo. N= 5. (B) Comparación de la cantidad de BP que queda en las células CLs+BP después de el co-cultivo con células indicadoras (-CLs, barra blanca) o con otras células CLs+BP (+CLs, barra naranja). N=5. (C) Imágenes representativas de microscopía confocal de células indicadoras co-cultivadas o no con células CLs+BP, en el canal rojo se muestra el marcador CellTrace DDAO-SE y en el canal verde el BP. \*\*: p-valor<0,01.



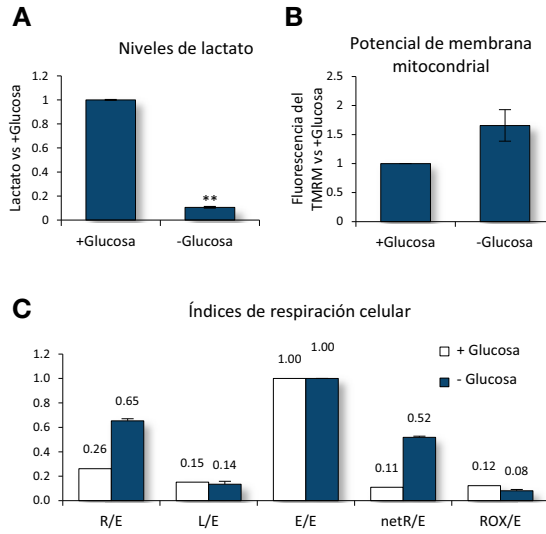


# EFFECTO DE LA LOCALIZACIÓN DE LOS CUERPOS LIPÍDICOS SOBRE SU METABOLIZACIÓN

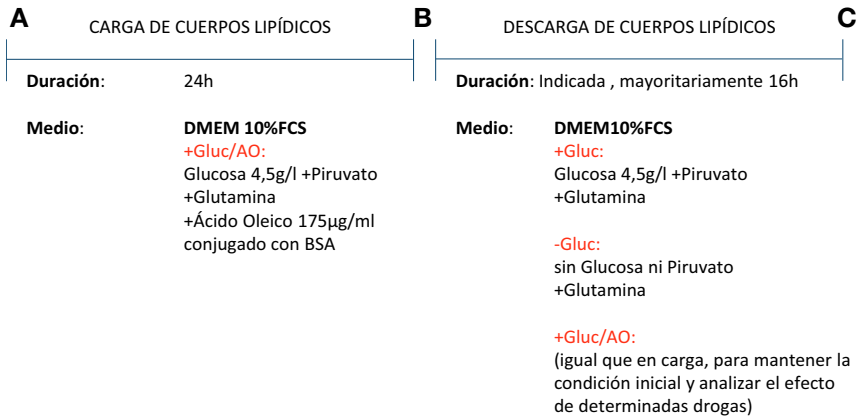
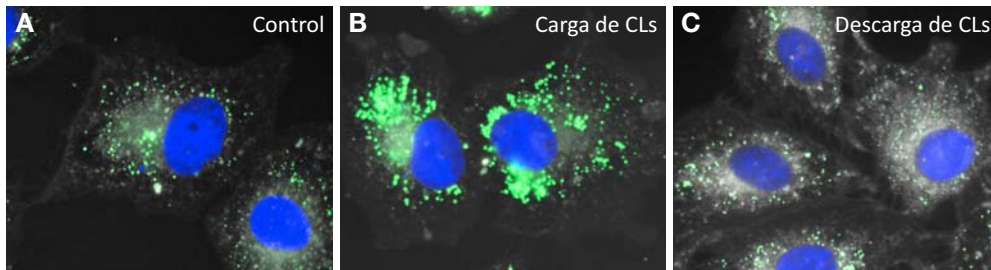
En estudios previos, nuestro grupo demostró que la expresión de un dominante negativo de la caveolina-1 impide el movimiento de los CLs y también inhibe su metabolización en condiciones de descarga (en un medio sin AO) [115], sugiriendo una relación entre el movimiento de los CLs y su metabolización. Con el objetivo de estudiar esa relación decidimos analizar la localización y el movimiento de los CLs en diferentes condiciones metabólicas así como la metabolización de los CLs en dichas condiciones.

Dado que los AGs contenidos en los CLs son el principal reservorio de energía de la célula [104] y que su metabolización para obtener energía depende del metabolismo oxidativo mitocondrial, quisimos analizar el comportamiento de los CLs en una situación de depleción energética, donde postulamos que los AGs serían usados para obtener energía, y compararlo con una situación metabólica en la que no fueran destinados a dicho uso. Para ello escogimos como modelo los fibroblastos. En contraposición a otras líneas celulares como los hepatocitos, los fibroblastos, y en especial las células Vero, realizan metabolismos opuestos en presencia o ausencia de glucosa. En presencia de ésta, los fibroblastos son básicamente glucolíticos, con una mayor producción de lactato (Figura 26A), mientras que en su ausencia realizan un cambio metabólico hacia la producción mitocondrial de ATP, como refleja el incremento de los índices de respiración R/E y netR/E (Figura 26C, para explicación de los índices ver Material y métodos). En consonancia con este cambio metabólico el potencial de membrana mitocondrial aumenta en ausencia de glucosa (Figura 26B). Por lo tanto, mediante la incubación en presencia o ausencia de glucosa las células Vero pasan de un metabolismo glucolítico a un metabolismo oxidativo, donde presumiblemente los CLs podrán ser usados para la obtención de energía.

Durante esta parte del trabajo, se usarán fibroblastos cargados de CLs, que aparecen en forma de grandes racimos perinucleares (Figura 28A), y se promoverá su metabolización mediante el tratamiento con diferentes medios e inhibidores (descarga de CLs). El Esquema 4 detalla los tratamientos usados en este bloque y la Tabla 1 de Resultados los diferentes inhibidores usados.



**Figura 26. Metabolismo diferencial de los fibroblastos en presencia o ausencia de glucosa.** (A) Niveles de lactato secretado al medio en células Vero durante un tratamiento de 16h en presencia o ausencia de glucosa. N=2. \*\*: p-valor<0,01. (B) Análisis del potencial de membrana mitocondrial en células tratadas 16h con o sin glucosa y teñidas con TMRM. N=3. (C) Respirometría de alta resolución en células en medio control (+ Glucosa) o después de un tratamiento de 6h en medio sin glucosa (- Glucosa). Tasas de respiración explicadas en materiales y métodos.



Esquema 4. Esquema de los tratamientos realizados en este bloque.

Droga	Dosis	Efecto	Medio de tratamiento	Duración tratamiento
AICAR	2,5mM	Activa la AMPK	+Gluc / AO	16h
Antimicina A (AntA)	2,5µM	Inhibe el CIII de la cad. resp.	+Gluc o - Gluc	16h
Compound C (Comp. C)	10-20µM	Inhibe la AMPK	+Gluc o - Gluc	16h
2-deoxiglucosa (2-DG)	20mM	Inhibe la glucolisis	+Gluc / AO	16h
DEUP	500µM	Inhibe las lipasas	+Gluc o - Gluc	16h
Etomoxir (ETO)	100µM	Inhibe la β-oxidación	+Gluc o - Gluc	16h
H89	10-20µM	Inhibe la PKA	+Gluc o - Gluc	16h
Nocodazol (NOC)	15µM	Despolimeriza microtúbulos	- Gluc	16h o tiempos cortos (2-4h)
Oligomicina (Omy)	0,4ng/ml	Inhibe la ATP sintasa	+Gluc o - Gluc	16h
Parthenolide (PTN)	50µM	Inhibe las tubulina carboxipeptidasas	- Gluc	1h
Taxol	30µM	Estabiliza los microtúbulos	+Gluc / AO	1,5 h
TrichostatinA (TSA)	33nM	Inhibe las deacetilasas	+Gluc / AO	16h

Tabla 1. Tabla con las drogas usadas en este apartado, la dosis y tiempo de tratamiento habitual.



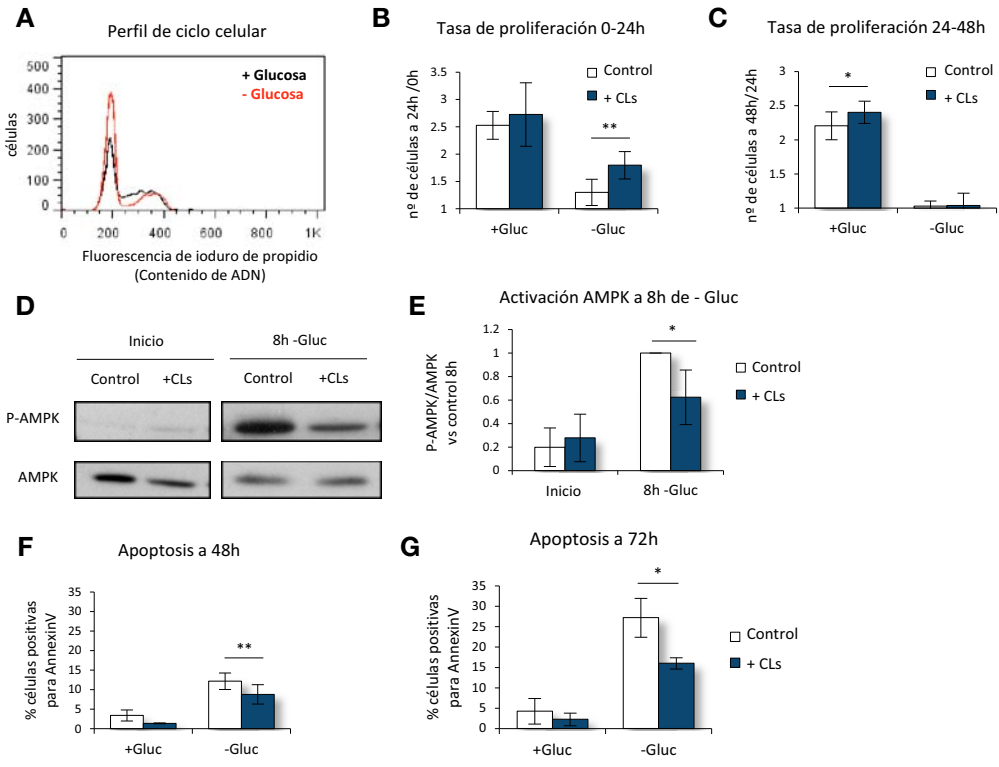
## **4.1 Los CLs retrasan la parada en el ciclo celular y la apoptosis inducidas por la falta de glucosa**

El ayuno de glucosa provoca una rápida parada del ciclo celular en fase G1 (Figura 27A). Mediante conteo celular, se observó que la carga de CLs en células Vero retrasa la inhibición de la proliferación, puesto que durante las primeras 24h la tasa de proliferación en ausencia de glucosa es significativamente mayor en células con CLs (Figura 27B).

La inhibición del ciclo celular causada por el ayuno de nutrientes depende principalmente de AMPK y p53 [621, 622]. En coherencia con una menor parada en el ciclo celular, observamos una disminución significativa en la activación de la AMPK a las 8h de ayuno de glucosa en las células con CLs (Figura 27D y E), sugiriendo un papel protector de los CLs frente al estrés metabólico.

El ayuno de glucosa acaba provocando la muerte celular por apoptosis ([623-626] y Figura 27F y G, barras blancas). De forma similar a lo sucedido en la proliferación, la presencia de CLs retrasa la activación de la apoptosis en estas condiciones (Figura 27F y G), similar a lo descrito recientemente [233].

Así, la presencia de CLs representa una ventaja para la respuesta al ayuno en estas células, retrasando la inhibición del ciclo celular y la apoptosis.



**Figura 27. La presencia de CLs retrasa la parada del ciclo celular y la inducción de apoptosis por ayuno de glucosa.** (A) Perfil de ciclo de células Vero al cabo de 16h de tratamiento con o sin glucosa. (B y C) Tasas de proliferación durante las primeras 24h (B) o entre 24 y 48h (C) de células inicialmente no cargadas (control) o cargadas (+CLs) con CLs, tratadas en presencia o ausencia de glucosa. N=3-4. (D y E) Inmunodetección representativa (D) y cuantificación (E) de la cantidad de AMPK fosforilada (P-AMPK) y la cantidad de AMPK total en células no tratadas (control) o cargadas con CLs (+CLs) antes (Inicio) o después de 8h en medio sin glucosa (8h -Gluc). N=5. (F y G) Cuantificación de la apoptosis a 48h (F) y 72h (G) de tratamiento en medio sin glucosa de células control o anteriormente cargadas de CLs. N=3. \*: p-valor<0,05 \*\*: p-valor<0,01.

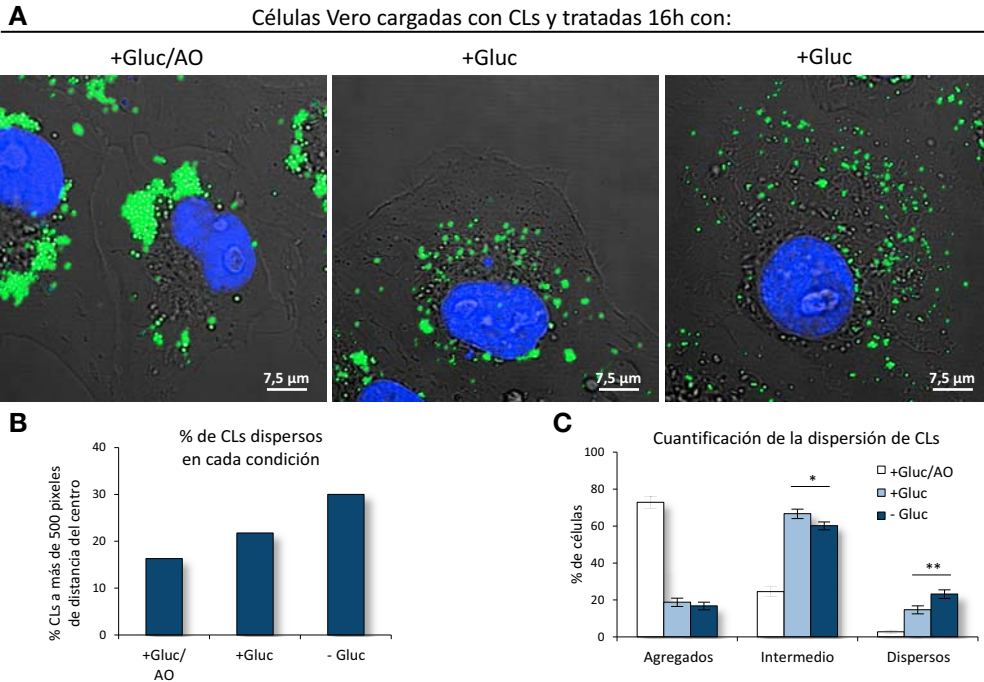
## 4.2 La falta de glucosa promueve la dispersión de los CLs en fibroblastos

Dado que los CLs representan una ventaja en respuesta al ayuno, pasamos a estudiar el comportamiento de éstos orgánulos bajo esta condición. Como se ha comentado anteriormente, en células Vero, al cabo de 24h de tratamiento con AO, los CLs se encuentran agregados y en la región perinuclear (Figura 28A, panel izquierdo). El tratamiento de descarga sin glucosa durante 16h provoca la dispersión de los CLs por todo el citoplasma (Figura 28A, panel derecho), mientras que en presencia de glucosa, aunque también se observa su metabolización, los CLs se mantienen en la región central de la célula (Figura 28A panel central).

Para analizar la dispersión de los CLs se llevaron a cabo dos aproximaciones. La primera fue cuantificar la distancia de los CLs respecto al núcleo. Para ello se tomaron imágenes de microscopía confocal *in vivo* (como las de la Figura 28A), para evitar la fusión artefactual de CLs, que fueron analizadas en colaboración con Babu JN Reddy del laboratorio del Dr. Steven P. Gross de la Universidad de Irvine (USA). Considerando arbitrariamente como dispersos los CLs a una distancia mayor de 500 píxeles del núcleo, observamos que la descarga en ausencia de glucosa incrementa el porcentaje de CLs dispersos, mientras que las células descargadas en presencia de ésta mostraron un fenotipo intermedio (Figura 28B).

La segunda aproximación que realizamos fue la cuantificación de la proporción de células con los CLs completamente agregados, los CLs completamente dispersos o un fenotipo intermedio de dispersión (ver Material y métodos). Aunque se observa cierta dispersión en presencia de glucosa, el porcentaje de células con los CLs completamente dispersos era significativamente mayor en ausencia de glucosa (Figura 28C).

Para asegurar que se trata de una dispersión de los CLs desde la zona perinuclear y no de la síntesis *de novo* de éstos en la periferia, se siguieron por videomicroscopía mediante contraste de fases diferencial (DIC) durante la descarga. La refringencia característica de estos orgánulos permite su seguimiento [355, 356, 367, 627]. Durante el proceso de descarga en ausencia de glucosa se observa una disgregación de los agregados iniciales y una dispersión progresiva de los CLs desde la región perinuclear hacia regiones más periféricas (Video 5 en CD anexo). Por lo contrario, en presencia de glucosa, aunque también se observa su consumo y movimiento, los CLs se mantienen en la región central de la célula

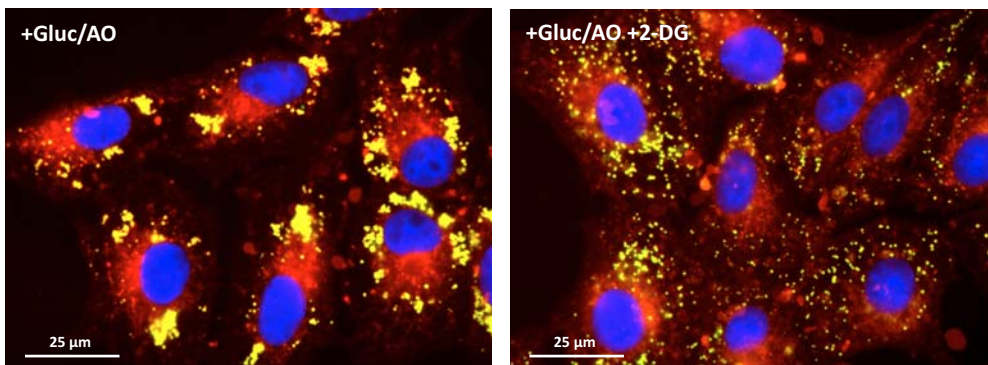


**Figura 28. La falta de glucosa promueve la dispersión de los CLs en células Vero.** (A) Imágenes de microscopía confocal *in vivo* de células Vero tratadas con AO durante 24h y posteriormente durante 16h con AO y glucosa (+Gluc/AO), en medio control con glucosa (+Gluc) o en medio sin glucosa (-Gluc). Las células han sido teñidas con Nile red (CLs, canal verde) y Hoechst (Núcleos, canal azul), y se muestra el contraste de fases (canal gris). (B) Cuantificación del porcentaje de CLs dispersos (considerando dispersión los CLs a más de 500 píxeles del centro de la célula) en el conjunto de células analizadas de cada condición. 20 células por experimento. N=1. (C) Cuantificación de la dispersión de CLs en imágenes de microscopía de epifluorescencia (ver Material y métodos). N=13. La significación estadística se ha calculado respecto a la descarga con glucosa. Las diferencias respecto al tratamiento con glucosa y oleico son significativas en todos los casos con un p-valor inferior a 0,001. \*: p-valor<0,05 \*\*: p-valor<0,01.

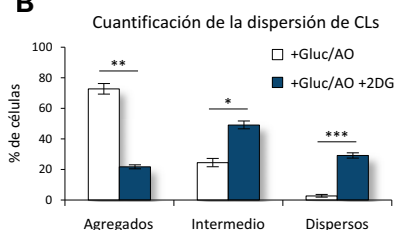
(Video 6 en CD anexo). La dispersión de los CLs en ausencia de glucosa fue corroborada en otras líneas celulares de fibroblastos como MEF y COS-1.

Como se ha comentado anteriormente, la 2-deoxiglucosa (2-DG) es un análogo no metabolizable de la glucosa con quien compete inhibiendo la glucólisis [598] y causando una depleción de ATP [628]. Al igual que la ausencia de glucosa, la adición de 2-DG provoca la dispersión de los CLs (Figura 29A, cuantificado en B).

A



B



**Figura 29. El tratamiento con 2-DG promueve la dispersión de los CLs.** (A y B) Imágenes de microscopía de epifluorescencia (A) y cuantificación de la dispersión de CLs (C) de células cargadas de CLs y tratadas 16h con AO con o sin 2-DG 20mM. Las células han sido teñidas con Nile red (CLs, canal verde y contorno celular, canal rojo) y DAPI (Núcleos, canal azul). N=5. \*: p-valor<0,05; \*\*: p-valor<0,01; \*\*\*: p-valor<0,001.

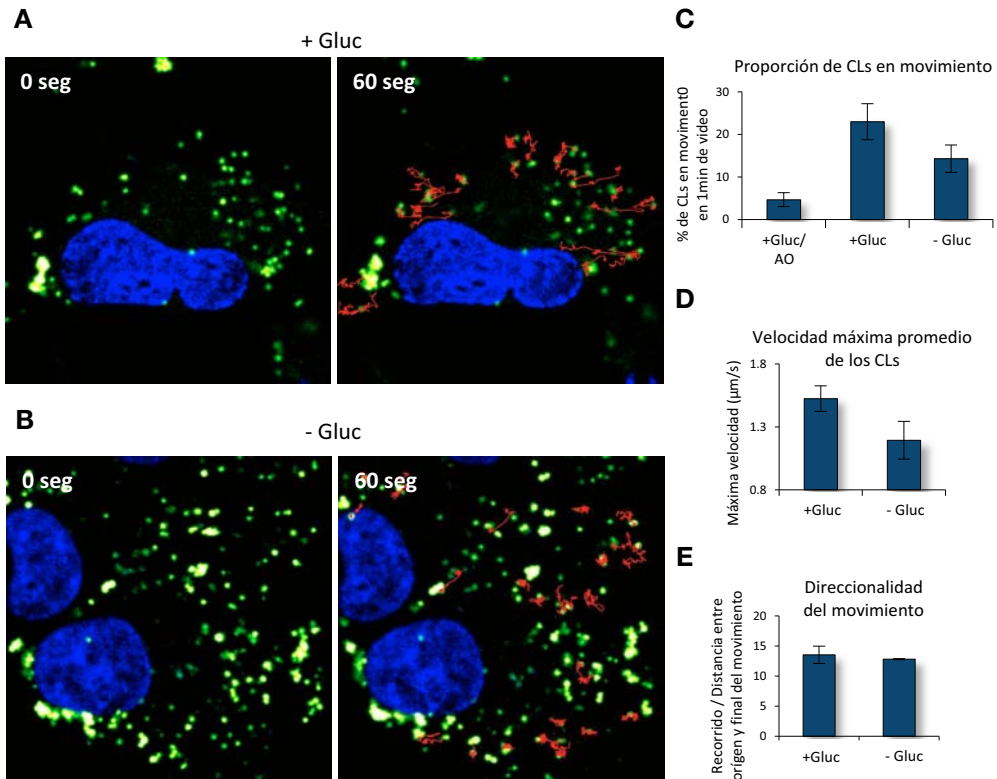
### 4.3 Caracterización del movimiento de los CLs en condiciones de descarga

El siguiente paso fue analizar si la mayor dispersión de los CLs conllevaba un incremento en su movilidad. El seguimiento de los CLs mediante videomicroscopía durante tiempos cortos nos permitió observar las dos clases de movimiento descritas para los CLs, el movimiento oscilatorio y el movimiento saltatorio [115, 350-354].

La descarga en ausencia de glucosa incrementó el movimiento, cuantificado como el porcentaje de CLs que realizaban movimientos saltatorios durante 60 segundos, respecto a aquellas células en que se mantiene el AO en el medio. Sorprendentemente, se observó una aún mayor proporción de CLs en movimiento durante la descarga en presencia de glucosa (Figura 30A, B y C y Videos 7 y 8 en CD anexo). Además, el análisis del movimiento de los CLs mediante el *plugin* MTrackJ de ImageJ [629] reveló que en presencia de glucosa, los CLs realizaban movimientos saltatorios a mayor velocidad máxima (la velocidad máxima a la que

se desplaza un CL en el momento en que realiza el movimiento saltatorio) (Figura 30D), y sin afectar a la direccionalidad (cuantificada como la ratio entre la longitud del recorrido y la distancia lineal entre las posiciones inicial y final del CL) (Figura 30E).

Así, la mayor dispersión sin glucosa no correlaciona con una mayor velocidad de movimiento de los CLs al final del tratamiento.



**Figura 30. Caracterización del movimiento de los CLs en condiciones de descarga.**

(A-E) Células cargadas de CLs y tratadas durante 16h en presencia (A) o ausencia (B) de glucosa, fueron teñidas *in vivo* con Nile red (CLs, canal verde) y Hoechst (Núcleos, canal azul), y grabadas mediante videomicroscopía confocal durante 1min. La proporción de CLs que mostraban movimientos saltatorios (C), así como la velocidad máxima (D) y direccionalidad de las trayectorias (E) de éstos fueron analizadas mediante el plugin MTrackJ de ImageJ. Las imágenes de A y B muestran el inicio y final del video, junto con la trayectoria de cada CL en rojo. N=2.

## **4.4 El movimiento y la dispersión de los CLs dependen de microtúbulos**

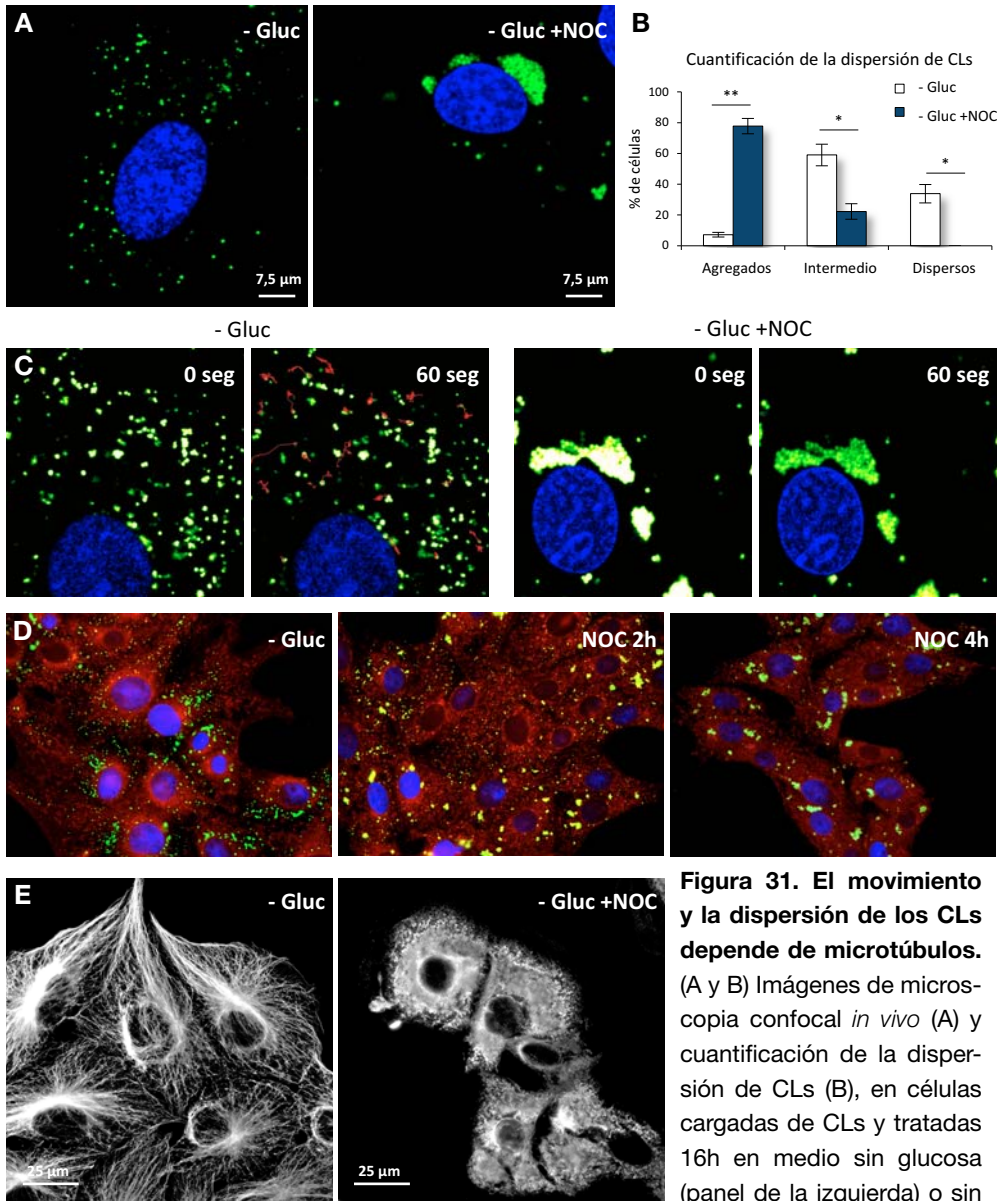
Se ha descrito que el movimiento de los CLs depende de microtúbulos (ver Introducción). Así, quisimos comprobar si la dispersión de los CLs observada en ausencia de glucosa también dependía de la presencia de una red de microtúbulos intacta.

La despolimerización de los microtúbulos con nocodazol (Figura 31E) inhibe completamente la dispersión (Figura 31A, cuantificado en B) y el movimiento (Figura 31C y Videos 9 y 10 en CD anexo) de los CLs promovidos por la ausencia de glucosa. En esta condición, los CLs forman racimos alrededor del núcleo, distribución similar a la observada en células mitóticas en metafase (datos no mostrados) donde los microtúbulos se destinan únicamente a la formación del huso mitótico. La presencia de una red de microtúbulos intacta no es sólo necesaria para la correcta dispersión de los CLs, sino que también lo es para el mantenimiento de dicha dispersión. El tratamiento con nocodazol en células con los CLs ya dispersos debido a la ausencia de glucosa, promueve la agregación de los CLs (Figura 31D).

Mediante estudios de proteómica, además de tubulina, también se ha detectado actina en los CLs. Aun así, en nuestro modelo, la despolimerización del citoesqueleto de actina mediante latrunculina B no impide la dispersión de los CLs en ausencia de glucosa (datos no mostrados) de acuerdo con estudios previos, realizados en presencia de glucosa, donde la despolimerización de actina no afectaba al movimiento de CLs [72].

Como conclusión, la dispersión de los CLs en ausencia de glucosa, depende básicamente del citoesqueleto de tubulina.





**Figura 31. El movimiento y la dispersión de los CLs depende de microtúbulos.** (A y B) Imágenes de microscopía confocal *in vivo* (A) y cuantificación de la dispersión de CLs (B), en células cargadas de CLs y tratadas 16h en medio sin glucosa (panel de la izquierda) o sin glucosa con NOC 15 $\mu$ M (panel de la derecha). N=3. \*: p-valor<0,05; \*\*: p-valor<0,01. (C) Células tratadas como en la Figura 30B (paneles de la izquierda) o añadiendo nocodazol durante las 16h de tratamiento sin glucosa (paneles de la derecha) y teñidas y captadas como en la Figura 30. Se muestran los planos inicial y final de videos de 1min, con las trayectorias de los CLs sobrepuestas en rojo. (D) Imágenes de microscopía de epifluorescencia de células cargadas de CLs, tratadas 16h en medio sin glucosa y finalmente las horas indicadas en medio sin glucosa con NOC 15 $\mu$ M. Las células han sido teñidas con Nile red (CLs, canal verde y contorno celular, canal rojo) y DAPI (Núcleos, canal azul). (E) Inmunocitoquímica detectando tubulina en células tratadas como en A.

Figura 31. El movimiento y la dispersión de los CLs depende de microtúbulos. (A y B) Imágenes de microscopía confocal *in vivo* (A) y cuantificación de la dispersión de CLs (B), en células cargadas de CLs y tratadas 16h en medio sin glucosa (panel de la izquierda) o sin glucosa con NOC 15 $\mu$ M (panel de la derecha). N=3. \*: p-valor<0,05; \*\*: p-valor<0,01. (C) Células tratadas como en la Figura 30B (paneles de la izquierda) o añadiendo nocodazol durante las 16h de tratamiento sin glucosa (paneles de la derecha) y teñidas y captadas como en la Figura 30. Se muestran los planos inicial y final de videos de 1min, con las trayectorias de los CLs sobrepuestas en rojo. (D) Imágenes de microscopía de epifluorescencia de células cargadas de CLs, tratadas 16h en medio sin glucosa y finalmente las horas indicadas en medio sin glucosa con NOC 15 $\mu$ M. Las células han sido teñidas con Nile red (CLs, canal verde y contorno celular, canal rojo) y DAPI (Núcleos, canal azul). (E) Inmunocitoquímica detectando tubulina en células tratadas como en A.



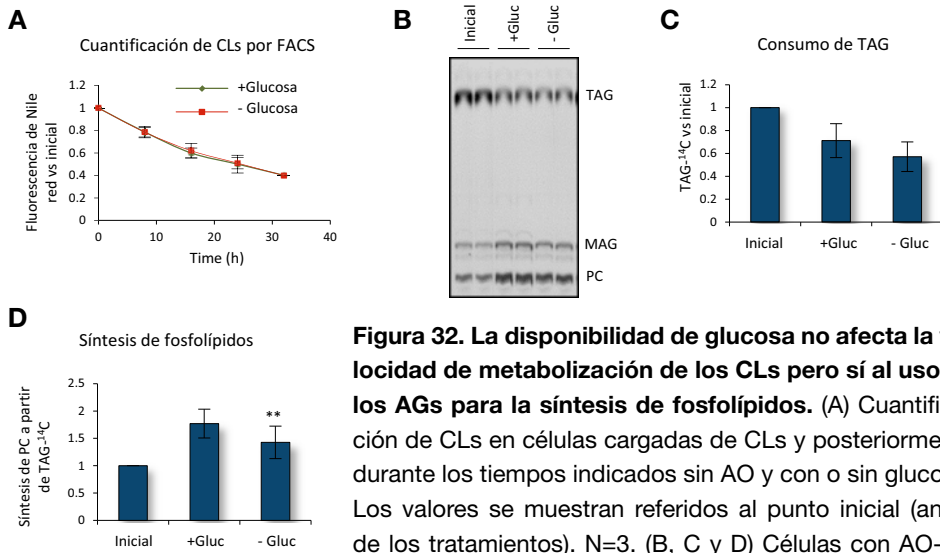
## **4.5 La presencia de glucosa promueve el uso de los CLs para la síntesis de fosfolípidos**

El análisis por microscopía reveló que tanto en presencia como en ausencia de glucosa, las células metabolizaban los CLs. La cuantificación del contenido de CLs confirmó que la velocidad de consumo de los CLs en fibroblastos es independiente de la presencia de glucosa (Figura 32A).

A pesar de descargarse a la misma velocidad, el destino metabólico de los AGs contenidos en los CLs podría ser diferente, de acuerdo con las diferencias observadas en la dispersión de los CLs.

Los AGs de los CLs pueden destinarse a la síntesis de fosfolípidos (ver Introducción). Para cuantificar este destino metabólico, se acumuló AO marcado radiactivamente en los CLs (ver Material y métodos) y se analizó mediante cromatografía en capa fina la radioactividad asociada a los diferentes lípidos en situación de descarga. Después de la carga, la mayor parte de radioactividad se encuentra en forma de TAG (Figura 32B, Inicial). Después de 16h sin AO, la radioactividad asociada a TAG disminuye e incrementa aquélla asociada a fosfolípidos indicando que durante la descarga los lípidos presentes en los CLs se usan para la síntesis de fosfolípidos (Figura 32B, cuantificado en C y D). La síntesis de fosfolípidos a partir de CLs fue significativamente mayor en presencia de glucosa que en ausencia de ésta (Figura 32B, cuantificado en D).

La mayor síntesis de fosfolípidos derivados de CLs en presencia de glucosa podría ser debida a que en esta situación hay una mayor proliferación celular, con un requerimiento de fosfolípidos más elevado. Asimismo, el uso de los CLs para la síntesis de fosfolípidos en presencia de glucosa podría explicar el ligero, aunque significativo, incremento de proliferación observado en presencia de glucosa en las células con CLs (Figura 27B y C).



**Figura 32. La disponibilidad de glucosa no afecta la velocidad de metabolización de los CLs pero sí al uso de los AGs para la síntesis de fosfolípidos.** (A) Cuantificación de CLs en células cargadas de CLs y posteriormente durante los tiempos indicados sin AO y con o sin glucosa. Los valores se muestran referidos al punto inicial (antes de los tratamientos). N=3. (B, C y D) Células con AO-<sup>14</sup>C acumulado en los CLs (ver Material y métodos) en las que

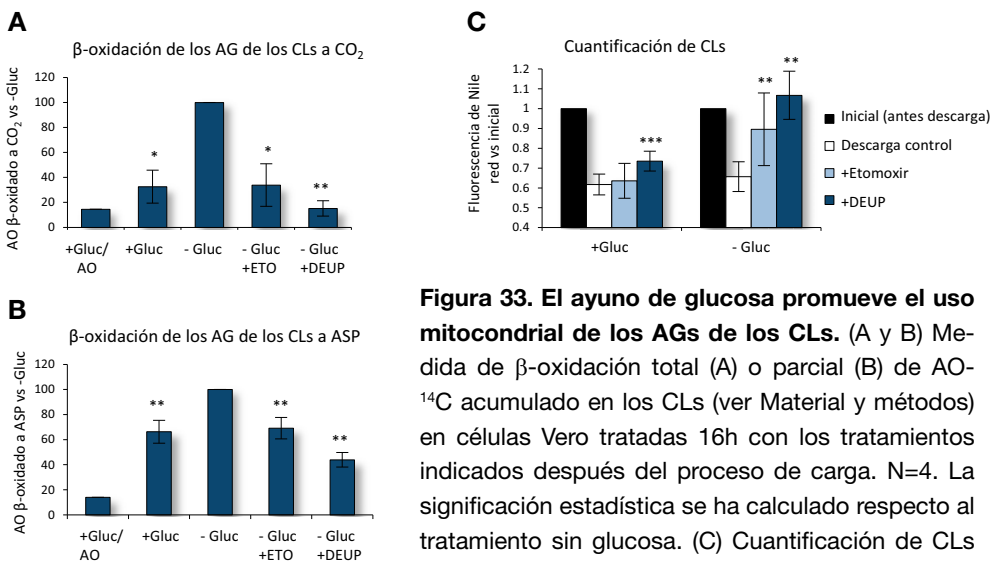
se ha analizado la distribución de <sup>14</sup>C en las diferentes especies lipídicas, antes (inicial) y después de 16h de tratamiento en medio con o sin glucosa. Se muestra una TLC representativa (B) y la cuantificación del <sup>14</sup>C contenido en TAG (C) y fosfatidilcolina (PC, D). La significación estadística se ha calculado respecto a la descarga con glucosa. N=3. \*\*: p-valor<0,01.

## 4.6 El ayuno de glucosa promueve el uso mitocondrial de los AGs de los CLs

Otro posible destino metabólico de los AGs de los CLs es la  $\beta$ -oxidación (ver Introducción). Dado que nuestras condiciones experimentales modifican el metabolismo energético de las células, decidimos analizar el uso de los AGs procedentes de los CLs para la obtención de energía mediante este proceso. Para ello, se acumuló AO radiactivo en los CLs como en el apartado anterior y se analizó, en diferentes situaciones de descarga, la radioactividad asociada a CO<sub>2</sub> ( $\beta$ -oxidación completa) y a ASP (acid soluble products,  $\beta$ -oxidación parcial de los AGs hasta acil-carnitina, acetil-CoA, cuerpos cetónicos o intermediarios del ciclo de Krebs) [630-632].

El ayuno de glucosa promovió el consumo de los AGs de los CLs por  $\beta$ -oxidación mitocondrial (Figura 33A y B), siendo significativamente mayor que en presencia de glucosa o que en las condiciones de carga. Además, el tratamiento

con etomoxir (inhibidor de la CPT-1, el transportador de AGs hacia el interior de la mitocondria) o DEUP (inhibidor de las lipasas), reduce significativamente los niveles de  $\beta$ -oxidación, demostrando que la  $\beta$ -oxidación detectada corresponde a los AGs procedentes de los CLs (Figura 33A y B). Además, la inhibición de la  $\beta$ -oxidación y de la lipólisis redujo la descarga de CLs de forma específica en ausencia de glucosa, sin afectar prácticamente a la descarga en presencia de ésta (Figura 33C), indicando que en condiciones de ayuno de glucosa, los fibroblastos realizan lipólisis y  $\beta$ -oxidación de los AG de los CLs.



**Figura 33. El ayuno de glucosa promueve el uso mitocondrial de los AGs de los CLs.** (A y B) Medida de  $\beta$ -oxidación total (A) o parcial (B) de AO-<sup>14</sup>C acumulado en los CLs (ver Material y métodos) en células Vero tratadas 16h con los tratamientos indicados después del proceso de carga. N=4. La significación estadística se ha calculado respecto al tratamiento sin glucosa. (C) Cuantificación de CLs en células Vero tratadas 24h con AO (Inicial) y posteriormente descargadas 16h con o sin glucosa (Descarga control) o adicionalmente con Etomoxir 100 $\mu$ M o DEUP 500 $\mu$ M. La significación estadística se ha calculado en cada caso en base a su descarga control (con o sin glucosa). N=5. \*: p-valor<0,05; \*\*: p-valor<0,01; \*\*\*: p-valor<0,001.

También se observa una mayor secreción al medio de AGs marcados radioactivamente procedentes de los CLs en ausencia de glucosa que en presencia de ésta (datos no mostrados). Puesto que la secreción de AG al medio se ha usado como medida indirecta de la lipólisis [98, 102, 437], y que el inhibidor de la lipólisis tiene un mayor efecto inhibitorio sobre la descarga de CLs en condiciones

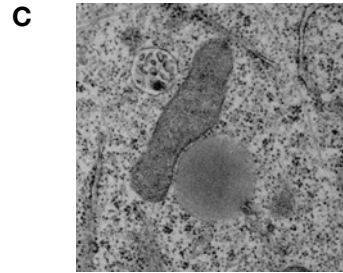
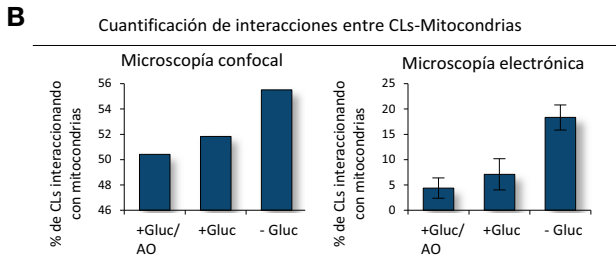
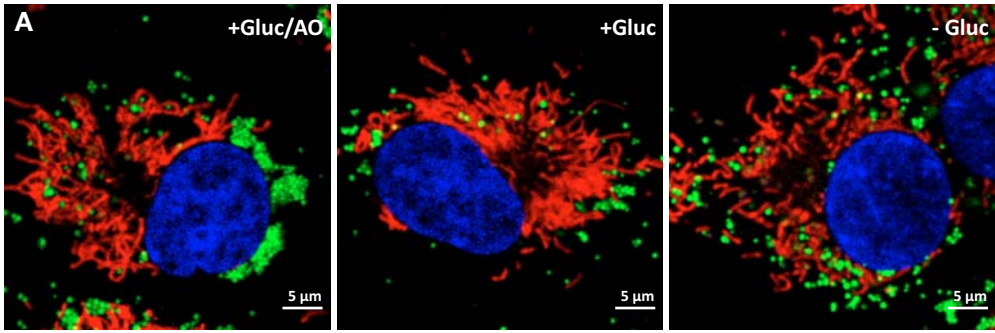
de ayuno de glucosa, postulamos que en estas condiciones los CLs estarían sufriendo una mayor lipólisis citosólica. La síntesis de fosfolípidos a partir de lípidos neutros contenidos en los CLs no requiere necesariamente de una lipólisis completa de los TAG contenidos en éstos, dado que puede realizarse a partir de DAG y sin necesidad de la activación del AG a acil-CoA [170, 491]. Este hecho podría explicar la menor sensibilidad del consumo de los CLs a inhibidores de las lipasas observada en estas condiciones, a pesar de la igual tasa de metabolización.

Así, aunque la disponibilidad de glucosa en el medio no controla la velocidad de consumo de los CLs en estas células, sí estaría controlando la forma en que se metabolizan y el destino de los AGs contenidos en ellos, siendo mayor la proporción destinada a fosfolípidos en presencia de glucosa y mayor la destinada a lipólisis y  $\beta$ -oxidación en su ausencia.

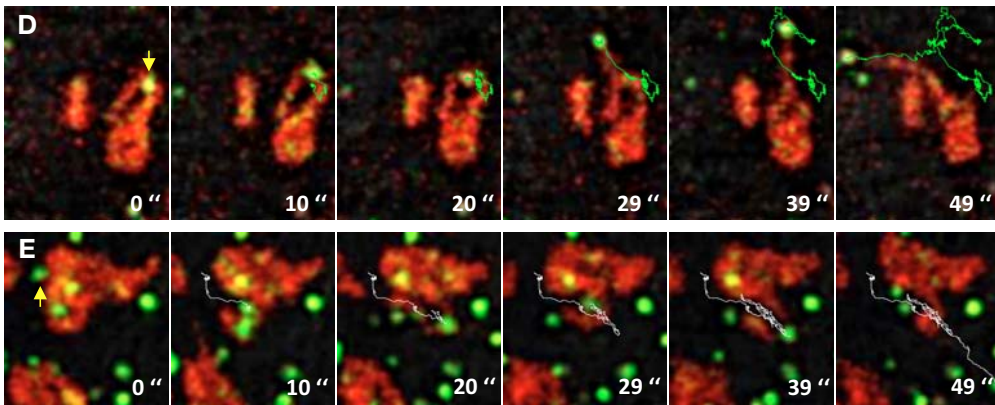
## 4.7 El ayuno de glucosa promueve la interacción entre CLs y mitocondrias

Dado que la ausencia de glucosa implicaba una mayor  $\beta$ -oxidación mitocondrial y que además, el ayuno de nutrientes provoca la elongación y redistribución de las mitocondrias hacia una localización más periférica [633, 634], nos planteamos si los cambios de localización de los CLs en los tratamientos indicados conllevaban una localización diferencial con respecto a las mitocondrias. Mediante microscopía confocal *in vivo*, analizamos la distribución de ambos orgánulos. En ausencia de glucosa se observó la dispersión de los CLs y se confirmó la mayor elongación y dispersión mitocondrial (Figura 34A). El ayuno de glucosa provocó un incremento en la proporción de CLs interaccionando con mitocondrias, cuantificado en colaboración con Babu JN Reddy (Figura 34B, panel izquierdo). Estos resultados fueron confirmados en colaboración con Samantha Murphy del laboratorio del Prof. Robert G. Parton del IMB (Australia), mediante el estudio por microscopía electrónica de células Vero tratadas como en el caso anterior, donde se analizó la proporción de CLs interaccionando con mitocondrias (Figura 34B, panel derecho, ejemplo de interacción en Figura 34C).

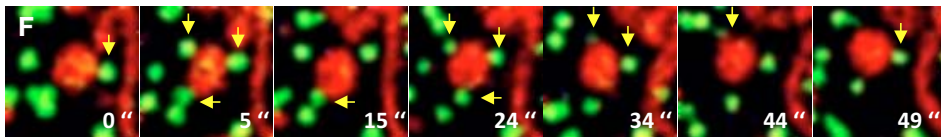
El tratamiento con 2-DG también provocó una mayor elongación mitocondrial, dispersión de los CLs e interacción entre CLs y mitocondrias (datos no mostrados).



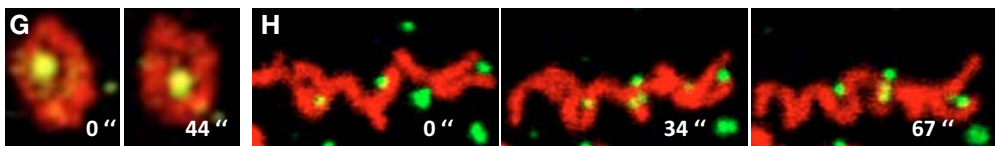
Ejemplos de interacciones estables y dinámicas entre CLs y mitocondrias:



Ejemplo de interacciones puntuales y dinámicas (*kiss and run*) entre CLs y mitocondrias:



Ejemplos de interacciones estáticas, de toda la superficie del CL(G) o puntuales (H):



**Figura 34. El ayuno de glucosa promueve la interacción entre CLs y mitocondrias.**

(A) Imágenes de microscopía confocal *in vivo* de células Vero cargadas de CLs y posteriormente 16h más con los tratamientos indicados. Las células fueron teñidas con Nile red (CLs, canal verde); Hoechst (Núcleos, canal azul) y Mitotracker-Deep red (Mitocondrias, canal rojo). (B, izquierda) Cuantificación de la proporción de CLs interaccionando con mitocondrias en células tratadas como en A, a partir de imágenes de microscopía confocal. N=1. (B, derecha) Cuantificación de la interacción CL-Mitocondria en imágenes de microscopía electrónica en células Vero tratadas como en A. N=1. (C) Ejemplo de interacción CL-Mitocondria visualizada por microscopía electrónica. (D-H) Diferentes clases de interacción entre CLs y mitocondrias observados por videomicroscopía confocal de células COS-1 (D-G) o Vero (H) cargadas de CLs, tratadas 16h sin glucosa y teñidas como en A. Se muestran algunas imágenes tomadas a los tiempos indicados, los videos completos se encuentran en el CD adjunto. Se observan interacciones fuertes donde el CL arrastra la mitocondria (D y E), interacciones a modo de *kiss and run* (F, las flechas amarillas indican el momento en que cada CL interacciona con la mitocondria) o interacciones estáticas (F y G), observándose CLs completamente envueltos por mitocondrias (F) o manteniendo de forma estable una interacción puntual con éstas (G).

La dinámica de la interacción CL-mitocondria se ha estudiado en células esteroidogénicas [352] donde se le postula un papel en el aporte de lípidos para la síntesis de hormonas en las mitocondrias, pero no en fibroblastos. Mediante el análisis por videomicroscopía confocal, tanto en células Vero como en células COS-1, detectamos diferentes tipos de interacción entre estos orgánulos.

En muchos casos se observan interacciones muy dinámicas, debido al movimiento de estos orgánulos. Frecuentemente, se observan contactos cortos y puntuales a modo de *kiss and run* (Figura 34F y Video 11 en CD anexo), también se observan interacciones muy fuertes, que se ponen de manifiesto en CLs en movimiento. Por ejemplo, se han detectado CLs que al moverse arrastran (Figura 34D y Video 12 en CD anexo) o empujan (Figura 34E y Video 13 en CD anexo) a mitocondrias. En otros casos se observan CLs deslizándose a lo largo de mitocondrias (Video 14 en CD anexo).

Los CLs y las mitocondrias también muestran interacciones más estáticas, que se mantienen durante un período de tiempo más largo. En este sentido se observan CLs con un solo contacto puntual con una mitocondria (Figura 34H y Video 15 en CD anexo) y en algunos casos mitocondrias envolviendo completamente a un CL (Figura 34G y Video 16 en CD anexo).

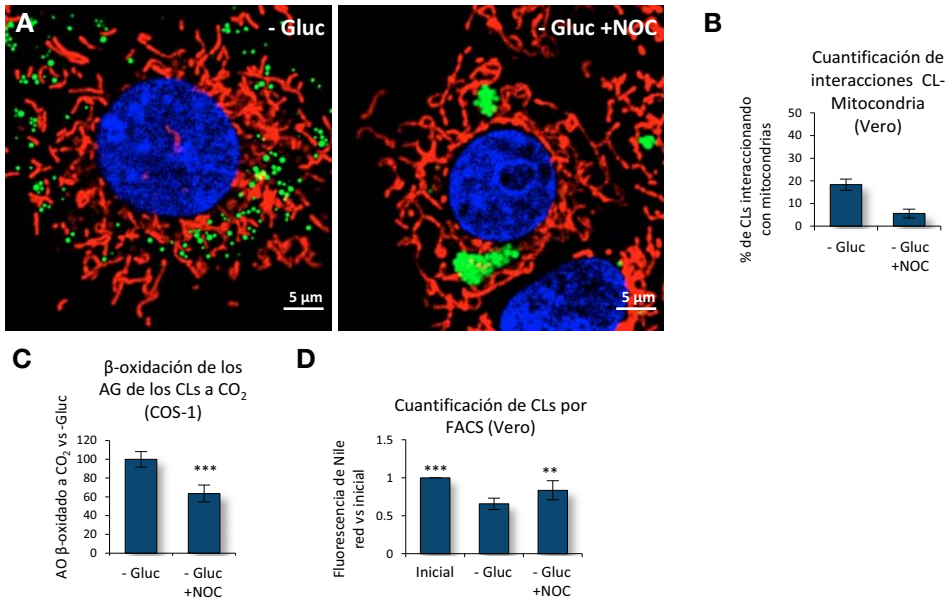
## 4.8 La interacción entre CLs y mitocondrias depende de microtúbulos

El siguiente paso fue analizar el efecto de la inhibición de la dispersión de los CLs sobre su interacción con las mitocondrias.

Para ello analizamos por microscopía confocal *in vivo* la distribución de los CLs en células cargadas y posteriormente descargadas en medio sin glucosa en presencia o ausencia de nocodazol. El tratamiento con nocodazol reduce la proporción de CLs en contacto con las mitocondrias (Figura 35A), observándose de forma frecuente una separación física entre los racimos de CLs y las mitocondrias adyacentes. Esta inhibición de la interacción CL-mitocondria fue cuantificada mediante microscopía electrónica (Figura 35B). Además, el tratamiento con nocodazol también reduce la  $\beta$ -oxidación de los AGs contenidos en los CLs (Figura 35C) y la metabolización de los CLs en ausencia de glucosa (Figura 35D).

Estos resultados indican que la presencia de una red de microtúbulos intacta sería necesaria para la dispersión de los CLs, su interacción con las mitocondrias y para la correcta metabolización de los AGs contenidos en los CLs mediante la  $\beta$ -oxidación mitocondrial.





**Figura 35. La interacción de CLs con mitocondrias y el uso de sus AGs para la  $\beta$ -oxidación depende de microtúbulos.** (A) Imágenes de microscopía confocal *in vivo* de células Vero (A) tratadas 24h con AO y posteriormente 16h en medio sin glucosa con (panel de la derecha) o sin (panel de la izquierda) NOC 15 $\mu$ M. Las células fueron teñidas con Nile red (CLs, verde), Mitotracker-Deep red (Mitocondrias, rojo) y Hoechst (Núcleos, azul). (B) Cuantificación de la interacción CL-Mitocondria en células Vero tratadas como en A y analizadas mediante microscopía electrónica como en la Figura 34B, panel derecho. N=1. (D)  $\beta$ -oxidación analizada como en la Figura 33A en células COS-1 tratadas como en A. N=5. (E) Cuantificación del contenido de CLs en células Vero tratadas 24h con AO (Inicial) y posteriormente 16h como en A. N=4. Significación estadística respecto al tratamiento sin glucosa. \*\*: p-valor<0,01; \*\*\*: p-valor<0,001.

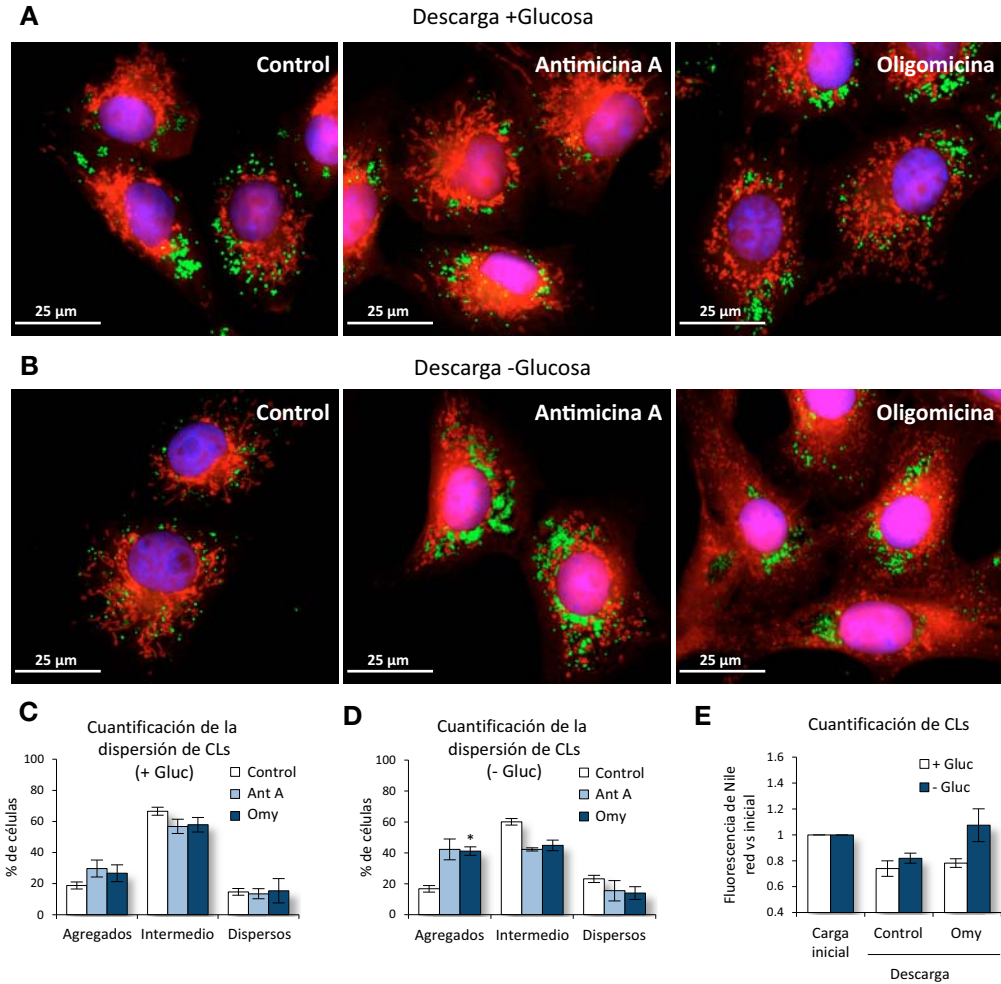


## **4.9 La dispersión y consumo de los CLs en ausencia de glucosa requiere de la actividad mitocondrial**

La elongación y mayor dinámica mitocondrial correlaciona con una mayor actividad mitocondrial [633]. Dado que en el seguimiento de la interacción entre CLs y mitocondrias se observan frecuentemente mitocondrias elongadas y móviles atrayendo a CLs nos planteamos la posibilidad de que la función mitocondrial estuviera afectando de alguna manera la dispersión de los CLs. Para estudiar el efecto de una alteración mitocondrial en nuestro modelo, tratamos células Vero cargadas de CLs, con antimicina A (AntA), inhibidor irreversible del complejo III de la cadena respiratoria [635] o con oligomicina (Omy), inhibidor de la ATP-sintasa mitocondrial [636]. Ambos tratamientos tienden a reducir la dispersión de los CLs en ausencia de glucosa, mientras que tienen un menor efecto en presencia de ésta (Figura 36A y B, cuantificado en C y D). Del mismo modo, la Omy tiende a inhibir la metabolización de los CLs específicamente en ausencia de glucosa (Figura 36E). El tratamiento con Omy o AntA provoca una mayor mortalidad celular en ausencia de glucosa (datos no mostrados y [637]), probablemente debido a la mayor necesidad del metabolismo mitocondrial que se da en situación de ayuno. Para evitar la interferencia de la citotoxicidad diferencial asociada a estas drogas en tratamientos largos, el efecto de la Omy sobre la descarga se analizó a las 8h de tratamiento.

Curiosamente, la dispersión y el consumo de los CLs en ausencia de glucosa también se ven reducidos en células MEF deficientes en caveolina-1 (datos no mostrados), que muestran una alteración mitocondrial ([587], ver primer apartado de Resultados y Anexo).

Por lo tanto, la dispersión de los CLs y su consumo vienen condicionados por una correcta función mitocondrial.



**Figura 36. La dispersión y consumo de los CLs en ausencia de glucosa requiere de la actividad mitocondrial.** (A y B) Imágenes de microscopía de epifluorescencia de células Vero cargadas de CLs y tratadas 16h más con o sin glucosa y añadiendo antimicina A (2,5 $\mu$ M) o oligomicina (0,4ng/ml). Posteriormente las células se han teñido *in vivo* con Mitotracker-red (Mitocondrias, canal rojo) y han sido fijadas y teñidas con BODIPY493/503 (CLs, canal verde) y DAPI (Núcleos, canal azul). (C y D) Cuantificación de la proporción de células con los CLs dispersos en las condiciones anteriores. N=4. La significación estadística se ha calculado con respecto a la descarga control (con o sin glucosa según si es C o D). \*: p<0,05. (D) Cuantificación del contenido de CLs en células tratadas como en A y B aunque analizando el contenido de CLs a 8h de tratamiento. N=3.

## 4.10 AMPK y PKA regulan la dispersión y el movimiento de CLs

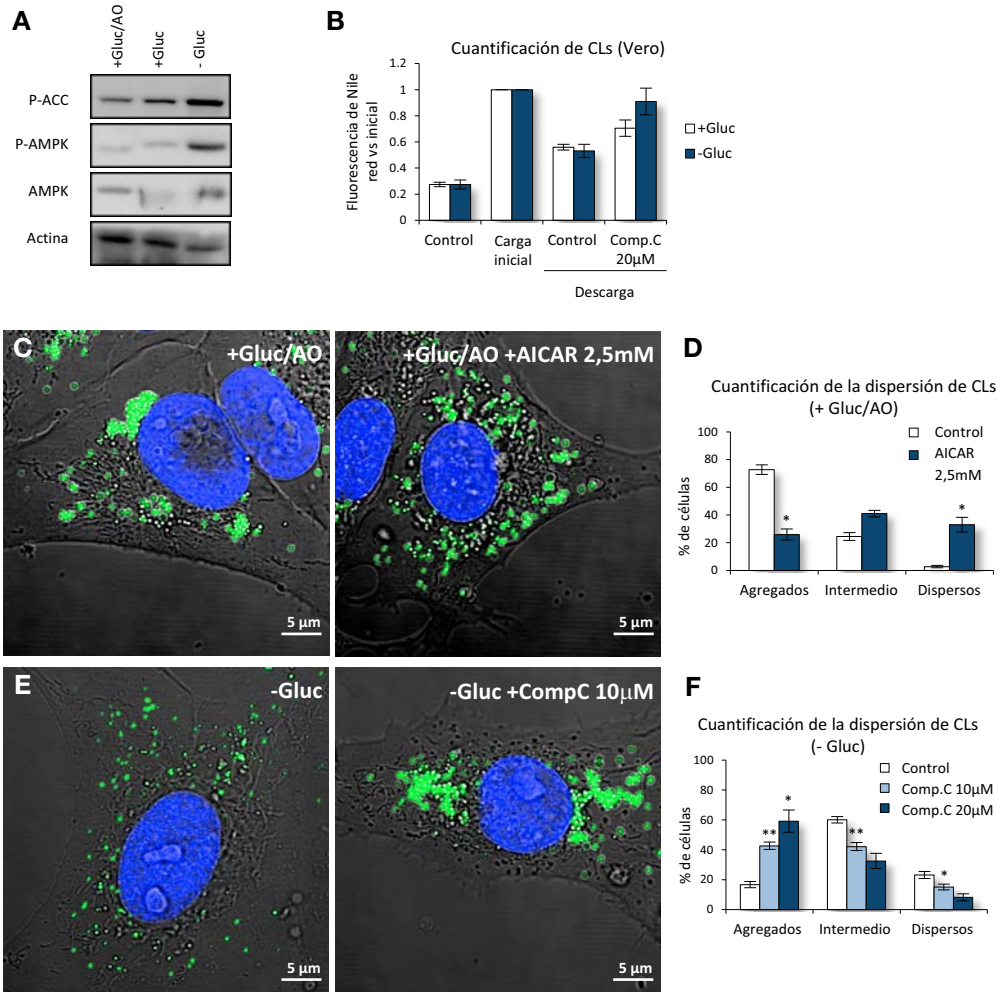
Seguidamente pasamos a analizar el mecanismo molecular que promueve la dispersión de los CLs en ausencia de glucosa. La AMPK es la principal quinasa implicada en la respuesta al ayuno [638], activando los procesos de obtención de energía como la  $\beta$ -oxidación e inhibiendo procesos que requieren de energía como la progresión en el ciclo celular [621, 622]. Recientemente se ha descrito que la actividad mitocondrial es necesaria para la activación de la AMPK en respuesta al ayuno [639]. Dado que en nuestro caso la inhibición de la actividad mitocondrial afectaba la localización de los CLs, decidimos estudiar si la AMPK también estaba implicada en la dispersión de los CLs en ausencia de glucosa.

En células Vero el ayuno de glucosa incrementa la fosforilación y la actividad de la AMPK, como indica la mayor fosforilación de su sustrato, la acetil-coenzimaA carboxilasa (ACC) (Figura 37A), tal y como está descrito en MEF [622].

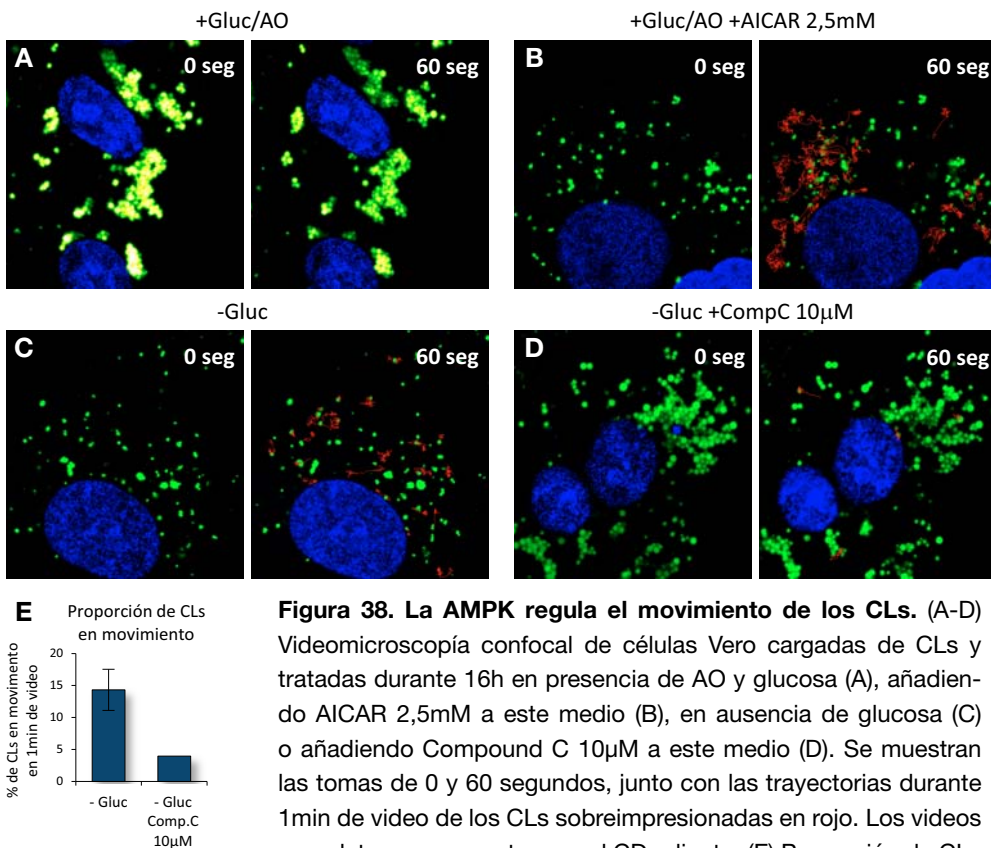
El AICAR es un precursor del ZMP, análogo del AMP que estimula la actividad AMPK [640]. El tratamiento con esta droga promueve la dispersión de los CLs en presencia de AO en el medio (situación en que los CLs se encuentran agregados) (Figura 37C, cuantificado en D), y además incrementa de forma drástica la movilidad de los CLs (Figura 38A y B). En consonancia con lo anterior, la inhibición de la AMPK mediante compound C, un inhibidor que se une cerca del sitio de unión a ATP de la AMPK [641], reduce la dispersión de los CLs (Figura 37E, cuantificado en F) y el movimiento de éstos (Figura 39C y D, cuantificado en E) causado por la ausencia de glucosa. Aunque en presencia de glucosa, la AMPK está menos activa (Figura 37A), su inhibición mediante compound C también muestra una tendencia a afectar la dispersión de los CLs (datos no mostrados). En cambio, la inhibición de la AMPK afectaría de forma más importante a la metabolización de los CLs en ausencia de glucosa que en presencia de ésta (Figura 37B).

Para confirmar la implicación de la AMPK en la dispersión de los CLs redujimos su expresión mediante un siRNA específico para las dos isoformas de la subunidad  $\alpha$ ;  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ . La disminución parcial de la expresión de AMPK tiende a reducir la dispersión de los CLs en ausencia de glucosa (datos no mostrados).

En conclusión, la activación de la AMPK controla la dispersión de los CLs en ausencia de glucosa. Resultados preliminares muestran que la reducción de la



**Figura 37. La activación de la AMPK es necesaria para la dispersión de los CLs.** (A) Inmuno-detección de fosfo-ACC, fosfo-AMPK (P-AMPK), AMPK y actina de las mismas muestras de lisados de células Vero cargadas con CLs y posteriormente 16h con los tratamientos indicados. (B) Cuantificación de la cantidad de CLs en células cargadas de CLs y tratadas con los tratamientos indicados durante 16h. (C-F) Imágenes de microscopía confocal *in vivo* (C y E) y cuantificación de la dispersión de los CLs (D y F) de células cargadas con CLs y tratadas 16h con los tratamientos indicados. Las células fueron teñidas con Nile red (CLs, verde) y Hoechst (Núcleos, azul). N=3 (AICAR). N=2-6 (Comp.C). Significancia calculada respecto al tratamiento control en cada caso. \*: p-valor<0,05 \*\*: p-valor<0,01.



**Figura 38. La AMPK regula el movimiento de los CLs.** (A-D) Videomicroscopía confocal de células Vero cargadas de CLs y tratadas durante 16h en presencia de AO y glucosa (A), añadiendo AICAR 2,5mM a este medio (B), en ausencia de glucosa (C) o añadiendo Compound C 10µM a este medio (D). Se muestran las tomas de 0 y 60 segundos, junto con las trayectorias durante 1min de video de los CLs sobreimpresionadas en rojo. Los videos completos se encuentran en el CD adjunto. (E) Proporción de CLs

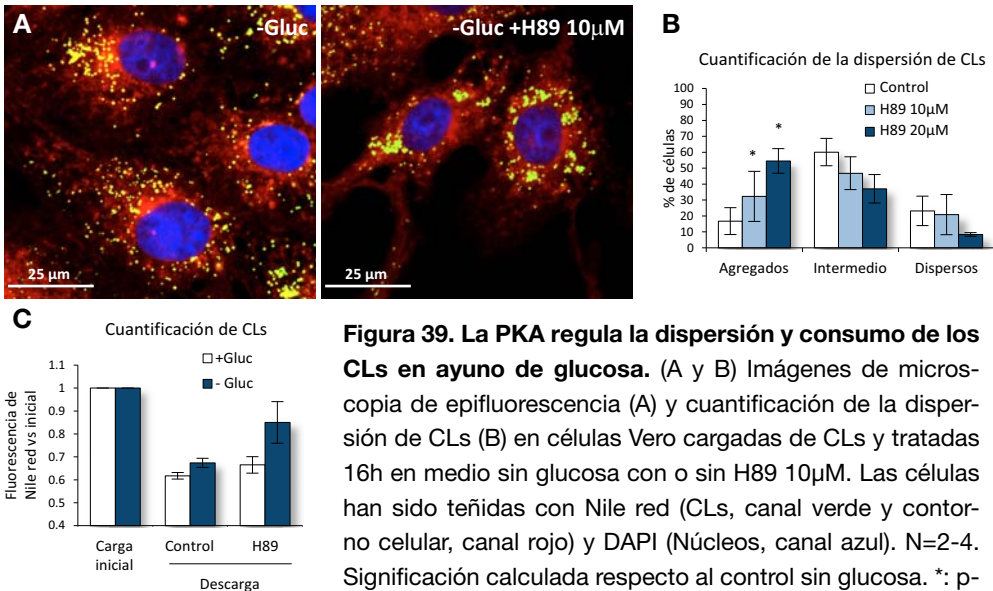
que mostraban movimientos saltatorios en 1min en los videos correspondientes a C y D. N=1-2.

expresión de AMPK afecta la localización de las mitocondrias, mientras que ni la activación ni la inhibición de la AMPK mediante drogas modifica su distribución (datos no mostrados). Así, mientras que la actividad de AMPK regularía la localización de los CLs, la distribución intracelular de las mitocondrias podría estar regulada por AMPK de forma independiente de su actividad.

Seguidamente analizamos la implicación de la quinasa PKA en el proceso de dispersión de los CLs. La PKA también se activa en respuesta a ayuno [633] y está implicada tanto en la regulación de la disgregación de los CLs [372] como en la activación de la lipólisis en adipocitos (ver Introducción). Además, esta quinasa se encuentra asociada a microtúbulos en neuronas [642] y en la regulación de la estabilidad de éstos [643].

La inhibición de la PKA mediante H89 disminuye la dispersión de los CLs en ausencia de glucosa (Figura 39A, cuantificada en B) y su metabolización (Figura 39C) en células Vero. Aunque la inhibición de la PKA también muestra una tendencia a reducir la dispersión de los CLs en presencia de glucosa (datos no mostrados), su efecto sobre la disminución de la metabolización de los CLs solo se observa en ausencia de ella.

En conclusión, la dispersión de los CLs durante el ayuno de glucosa requiere de la actividad AMPK y/o PKA, y la activación de la AMPK es suficiente para la dispersión de los CLs.



**Figura 39. La PKA regula la dispersión y consumo de los CLs en ayuno de glucosa.** (A y B) Imágenes de microscopía de epifluorescencia (A) y cuantificación de la dispersión de CLs (B) en células Vero cargadas de CLs y tratadas 16h en medio sin glucosa con o sin H89 10 $\mu$ M. Las células han sido teñidas con Nile red (CLs, canal verde y contorno celular, canal rojo) y DAPI (Núcleos, canal azul). N=2-4. Significación calculada respecto al control sin glucosa. \*: p-

valor<0,05 (C) Cuantificación de la cantidad de CLs en células cargadas de CLs y tratadas con los tratamientos indicados durante 16h. N=3.



## **4.11 El ayuno de glucosa modifica la dinámica de los microtúbulos y la estabilización de éstos provoca dispersión de CLs**

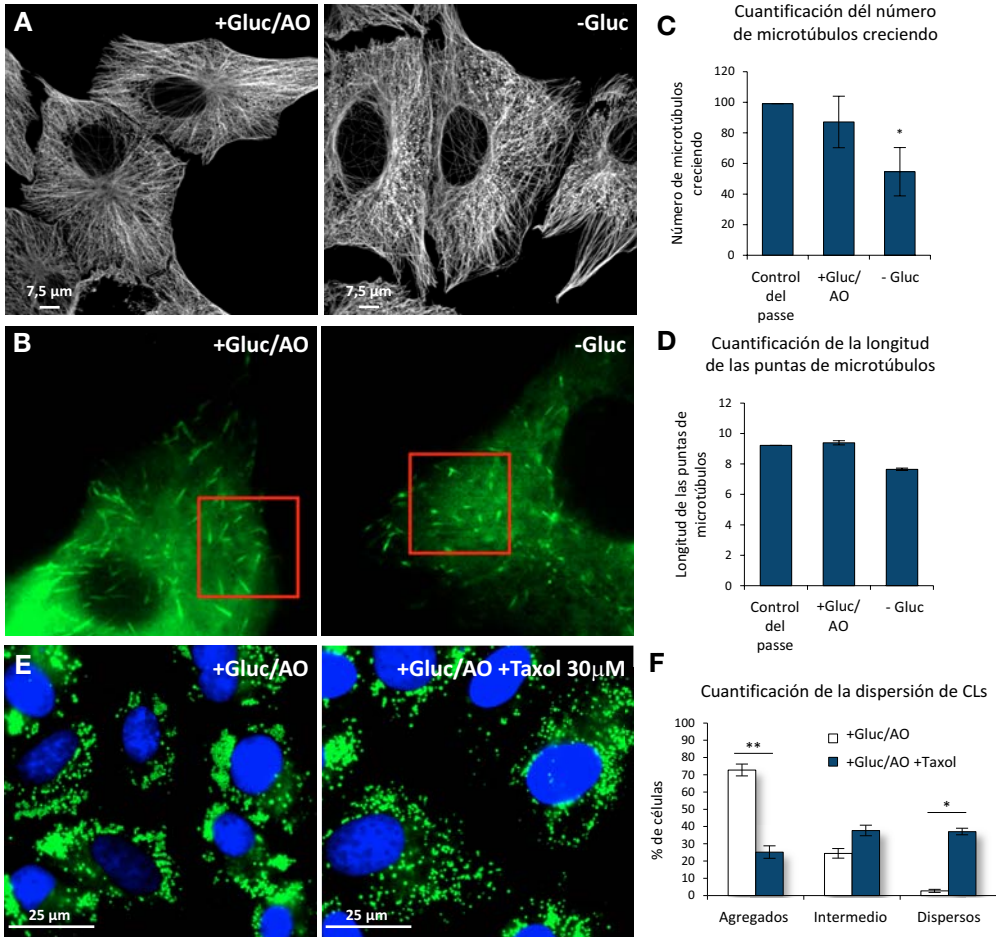
El ayuno de glucosa, además de promover la dispersión de CLs, también promueve una localización más periférica de mitocondrias (Figura 34A) y lisosomas/endosomas tardíos (datos no mostrados), cuyo movimiento también depende de microtúbulos. Ello nos llevó a pensar que el efecto del ayuno de nutrientes sobre la localización de los CLs podría deberse a una modificación global de la red de microtúbulos. Además, se ha descrito que tanto la AMPK como la PKA, cuya actividad hemos observado que regula la localización de CLs, regulan la dinámica y la polimerización de microtúbulos, especialmente durante la mitosis [643-647].

Así, pasamos a analizar cómo afectaba la dinámica de los microtúbulos a la dispersión de los CLs. Aunque no se observaron diferencias muy evidentes en la distribución de los microtúbulos en respuesta al ayuno (Figura 40A), la transfección de CLIP-170 que marca las puntas de crecimiento de los microtúbulos permitió observar que el ayuno de glucosa reduce el número de microtúbulos en crecimiento, así como la longitud del marcaje de CLIP-170 en las puntas de éstos (Figura 40B, cuantificado en C y D). Además, resultados preliminares de seguimiento de microtúbulos muestran que la depleción de glucosa reduciría la dinamicidad de los microtúbulos (datos no mostrados), calculada como en [648].

La reducción del número de microtúbulos crecientes y de la longitud del marcaje de CLIP-170 en éstas también se ha descrito al tratar células con taxol/paclitaxel [649], una droga que provoca la estabilización de los microtúbulos [650] y la reducción de su dinamicidad [651]. De forma interesante, el tratamiento con taxol promueve la dispersión de los CLs al añadirse durante 1h y 30min en presencia de AO (Figura 40E, cuantificado en F). Estos resultados sugieren un posible papel del control de la dinámica de los microtúbulos en la dispersión de los CLs en ausencia de glucosa.

Hemos observado que la estabilización de los microtúbulos mediante taxol incrementa la dispersión de los CLs. Aunque los mecanismos que regulan la dinámica de los microtúbulos son poco conocidos, se ha propuesto que modificaciones posttraduccionales de la tubulina como la acetilación o la detirosinación podrían estar regulando la estabilidad de los microtúbulos, o al menos serían un marcador de la población de microtúbulos estables [652, 653]. La estabilización

de los microtúbulos con taxol incrementa tanto la acetilación [654] como la de-tirosinación de los microtúbulos, por lo que nos preguntamos si el ayuno de nutrientes podría regular la dispersión de los CLs a través de estas modificaciones posttraduccionales de la tubulina.



**Figura 40. El ayuno de glucosa modifica la dinámica de los microtúbulos. La estabilización de éstos provoca la dispersión de los CLs.** (A) Inmunocitoquímica de tubulina en células Vero cargadas de CLs y tratadas 16h con los tratamientos indicados. (B-D) Células Vero transfectadas con GFP-CLIP-170, cargadas de CLs y tratadas 16h con los tratamientos indicados, posteriormente analizadas por microscopía de epifluorescencia *in vivo*. Imágenes representativas (B) y cuantificación del número de microtúbulos polimerizándose marcados por CLIP-170 (C) y de la longitud de las puntas de los microtúbulos (D). (E y F) Imágenes de microscopía de epifluorescencia (E) y cuantificación de la dispersión de CLs (F) en células cargadas de CLs (E, panel izquierdo) a las que añadió taxol (30 $\mu$ M) durante la última 1h y 30min (E, panel derecho). Las células fueron fijadas y teñidas con Nile red (CLs, canal verde) y DAPI (Núcleos, canal azul). N=3. \*: p-valor<0,05; \*\*: p-valor<0,01.



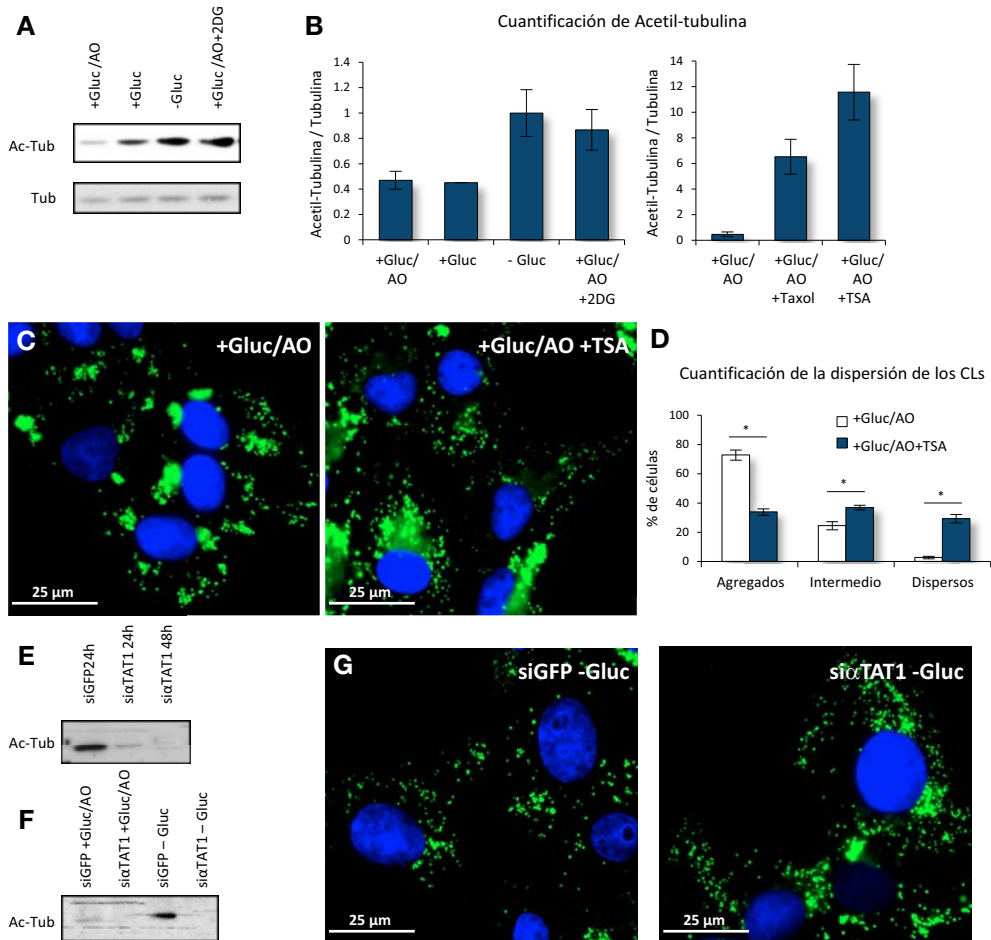
## 4.12 Efecto de la acetilación de la tubulina sobre la dispersión de los CLs

Se ha descrito que en condiciones de completa falta de nutrientes la acetilación de los microtúbulos incrementa afectando su estabilidad y la movilidad de los autofagosomas [655], y que las mitocondrias se mueven preferentemente sobre microtúbulos acetilados [656, 657], por lo que analizamos el efecto del ayuno de glucosa sobre la acetilación de los microtúbulos.

Inicialmente comprobamos que en nuestras condiciones la depleción de glucosa también causa una mayor acetilación de los microtúbulos (Figura 41A, cuantificado en B). Además el tratamiento con 2-DG, que promueve la dispersión de los CLs (Figura 29), también incrementa la acetilación de los microtúbulos (Figura 41A, cuantificado en B). La trichostatin A (TSA) es un inhibidor de deacetilasas entre las que se encuentra la HDAC6, una deacetilasa citosólica que se ha demostrado que se encarga, junto a Sirt2, de la deacetilación de los microtúbulos [658, 659]. Tanto el TSA como el taxol en nuestras condiciones incrementan la acetilación de microtúbulos (Figura 41B). El tratamiento de células Vero cargadas de CLs con TSA provoca un incremento significativo de la dispersión de los CLs (Figura 41C, cuantificado en D). Así, la dispersión de los CLs correlaciona en diferentes situaciones con una mayor acetilación de los microtúbulos.

Para determinar si la acetilación de los microtúbulos es necesaria para la dispersión de los CLs observada en ausencia de glucosa, se analizó la dispersión de los CLs en células que no pudieran acetilar la tubulina. Recientemente se había descrito una proteína capaz de acetilar microtúbulos ( $\alpha$ -tubulina acetiltransferasa( $\alpha$ TAT1)/MEC17, [660, 661]). La reducción de la expresión de la  $\alpha$ TAT1 en células Vero mediante siRNA reduce la cantidad de acetil-tubulina en condiciones control (Figura 41E) y además en estas células el tratamiento de ayuno de glucosa no es capaz de incrementar la acetilación de la tubulina (Figura 41F). Aun así, la inhibición de la acetilación de la tubulina en respuesta a ayuno de glucosa no afecta a la dispersión de los CLs (Figura 41G), únicamente se observa una tendencia de las células a acumular más CLs.

Como conclusión, la dispersión de los CLs y la acetilación de los microtúbulos son dos procesos independientes ambos activados por la ausencia de glucosa.



**Figura 41. La acetilación de microtúbulos correlaciona con la dispersión de CLs, aunque no es necesaria para este proceso.** (A y B) Inmunodetección de acetil-tubulina respecto a la tubulina total representativa (A) y cuantificación (B, panel izquierdo) en células Vero cargadas de CLs y tratadas 16h con los tratamientos indicados. N=4. (B, panel derecho) Cuantificación de la proporción de tubulina acetilada en células cargadas de CLs y tratadas 16h con AO; 16h con AO, las últimas 1h 30min de las cuales con taxol (30 $\mu$ M); o 16h con ácido oleico y TSA 33nM. (C y D) Imagen de microscopía de epifluorescencia (C) y cuantificación de dispersión de CLs (D) en células cargadas de CLs y tratadas 16h con AO con o sin TSA 33nM. N=3. \*: p-valor<0,05. Las células se han teñido con Nile red (CLs, canal verde) y DAPI (Núcleos, canal azul). (E y F) Inmunodetección de acetil-tubulina en muestras de células transfectadas con siRNA inespecífico (anti-GFP) o anti- $\alpha$ TAT1 durante 24 y 48h (E) o en células transfectadas con siRNAs anti-GFP y anti- $\alpha$ TAT1, posteriormente cargadas de CLs y tratadas 16h con los tratamientos indicados (F). (G) Imágenes de microscopía de epifluorescencia de células Vero tratadas como en F y teñidas como en C.

## **4.13 La dispersión de los CLs depende de la detirosinación de los microtúbulos**

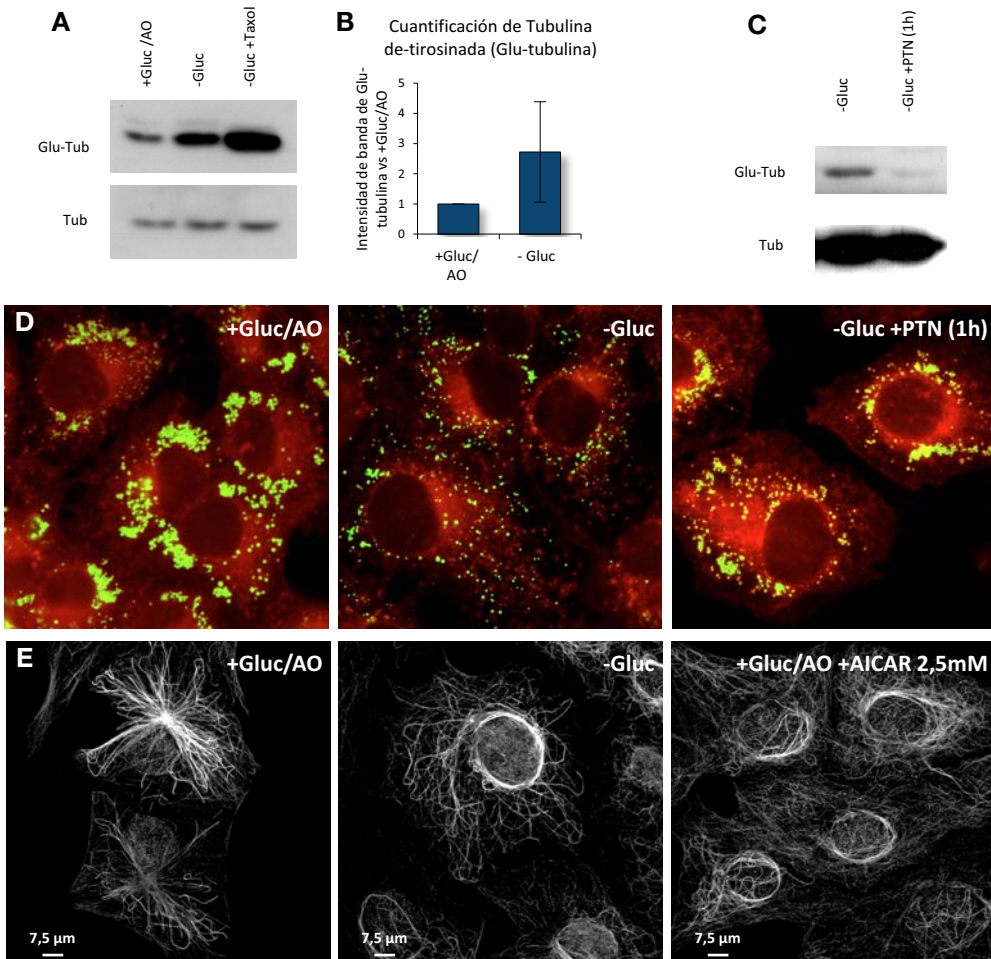
Como hemos comentado anteriormente, además de la acetilación, la estabilidad de los microtúbulos también se relaciona con su detirosinación. Del mismo modo que en el caso de la acetilación, el ayuno de glucosa incrementa la detirosinación de los microtúbulos (Figura 42A, cuantificado en B).

La inhibición de la detirosinación de los microtúbulos mediante el tratamiento con parthenolide [662] (Figura 42C) es capaz de revertir la dispersión de los CLs causada por el ayuno de glucosa (Figura 42D), apuntando a un papel importante de esta modificación posttraduccional de los microtúbulos en la dispersión de los CLs en respuesta al ayuno de glucosa.

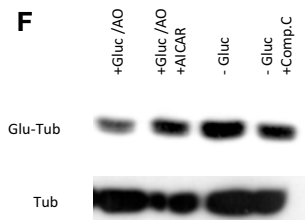
Además de un incremento en la cantidad de microtúbulos detirosinados, el ayuno de glucosa también modifica el patrón de microtúbulos detirosinados, pasando de un patrón radial a otro más en forma de trama, donde se observa frecuentemente un anillo de microtúbulos detirosinados alrededor del núcleo (Figura 42E). Cabe destacar que la activación de la AMPK mediante AICAR reproduce la misma alteración del patrón de microtúbulos detirosinados (Figura 42E).

Aunque está descrito que el tratamiento con AICAR en cardiomiocitos reduce la detirosinación de los microtúbulos [663], en nuestro modelo la activación de la AMPK promueve la detirosinación de microtúbulos y la inhibición de esta quinasa la reduce.

Estos resultados sugieren que el ayuno de glucosa a través de la actividad de la AMPK provocaría la detirosinación de la red de microtúbulos y como consecuencia la dispersión de los CLs.



**Figura 42. El ayuno de glucosa promueve la detirosinación de microtúbulos que es necesaria para la dispersión de los CLs.** (A y B) Inmunodetección representativa (A) y cuantificación (B) de tubulina detirosinada y tubulina total en células Vero cargadas de CLs y tratadas 16h con los tratamientos indicados. N=6. (C) Inmunodetección representativa de tubulina detirosinada y tubulina total en células Vero cargadas de CLs y tratadas 16h sin glucosa, con o sin Parthenolide 50µM (PTN) durante la última hora de incubación. (D) Imágenes representativas de microscopía de epifluorescencia de células tratadas como en C, fijadas y teñidas con Nile red (CLs, canal verde y membranas celulares, canal rojo). (E) Imágenes de microscopía confocal de inmunocitoquímica de tubulina detirosinada en células cargadas de CLs y tratadas 16h con los tratamientos indicados. (F) Inmunodetección representativa de tubulina detirosinada y tubulina total en células cargadas de CLs y tratadas 16h con los tratamientos indicados durante 16h.



(A y B) Inmunodetección representativa (A) y cuantificación (B) de tubulina detirosinada y tubulina total en células Vero cargadas de CLs y tratadas 16h con los tratamientos indicados. N=6. (C) Inmunodetección representativa de tubulina detirosinada y tubulina total en células Vero cargadas de CLs y tratadas 16h sin glucosa, con o sin Parthenolide 50µM (PTN) durante la última hora de incubación. (D) Imágenes representativas de microscopía de epifluorescencia de células tratadas como en C, fijadas y teñidas con Nile red (CLs, canal verde y membranas celulares, canal rojo). (E) Imágenes de microscopía confocal de inmunocitoquímica de tubulina detirosinada en células cargadas de CLs y tratadas 16h con los tratamientos indicados. (F) Inmunodetección representativa de tubulina detirosinada y tubulina total en células cargadas de CLs y tratadas 16h con los tratamientos indicados durante 16h.



---

# DISCUSIÓN





Del mismo modo que los Resultados, la Discusión de esta tesis se estructura en cuatro bloques. En el primer apartado se estudia la relación de la caveolina-1 con el metabolismo energético, mientras que en los tres posteriores se analizan diferentes aspectos de la biología celular de los CLs.

La caveolina-1 es una proteína relacionada con multitud de procesos y la disminución de su expresión causa enfermedades muy diversas, poco relacionadas entre sí. En esta tesis demostramos que la falta de caveolina-1 provoca la acumulación de colesterol mitocondrial que deriva en la disfunción de este orgánulo, hecho que postulamos podría ser común en las diferentes enfermedades con las que se ha relacionado esta proteína (Apartado I de la Discusión).

En los otros tres apartados se analizan diferentes aspectos de la biología celular de los CLs. A pesar de estar relacionados con múltiples procesos celulares y enfermedades muy relevantes, los mecanismos que regulan la formación, acumulación y metabolismo de los CLs son poco conocidos. Al ser tratadas con AGs, las células en cultivo forman CLs en pocos minutos, y la biogénesis de estos orgánulos en el RE requiere de la participación de ACSL3 (Apartado II de la Discusión). La acumulación de CLs en respuesta a AGs está regulada por la lipólisis basal y la  $\beta$ -oxidación basal de las células, aspectos que cambian dependiendo del tipo celular (Apartado III de la Discusión). Además, esta acumulación de CLs es heterogénea, siendo diferente incluso entre células del mismo tipo celular y en las mismas condiciones, especialmente en las células del hígado. Postulamos que la heterogeneidad en la acumulación de CLs en las células hepáticas sería un mecanismo de protección para la mayoría de células frente a la lipotoxicidad de los AGs, generando una subpoblación de células con mayor acumulación de CLs, con función análoga a la del tejido adiposo para el resto del organismo (Apartado III de la Discusión).

Finalmente, los CLs contienen AGs que pueden destinar a diferentes funciones metabólicas. En esta tesis demostramos que, en fibroblastos, en presencia de glucosa los lípidos de los CLs se destinarían preferentemente a la síntesis de fosfolípidos mientras que en ayuno se destinarían a la  $\beta$ -oxidación mitocondrial y a la exportación. En este sentido, los CLs retrasan la parada del ciclo celular y la apoptosis provocadas por la falta de glucosa (Apartado IV de la Discusión). Además, en estas condiciones, los CLs, inicialmente agregados en la zona perinuclear, se dispersan por el citoplasma e incrementa su interacción con las mitocondrias. En este mecanismo estarían implicadas las quinasas AMPK y PKA, y estaría regulado por la dinámica de microtúbulos (Apartado IV de la Discusión).





# PAPEL DE LA CAVEOLINA-1 EN EL METABOLISMO

En este apartado de la tesis mostramos que la deficiencia de caveolina-1 provoca un incremento de colesterol mitocondrial el cual reduce la fluidez de la membrana y la eficiencia en la respiración mitocondrial. Esta disfunción mitocondrial provoca que las células generen más estrés oxidativo.

## 1.1 La deficiencia de caveolina-1 incrementa el colesterol mitocondrial reduciendo la eficiencia en la respiración mitocondrial

El estrés oxidativo observado en células deficientes en caveolina-1 podría explicarse tanto por una menor eficiencia en la respiración que derivase en un mayor flujo de electrones desde la cadena respiratoria a radicales libres de oxígeno como por una menor capacidad antioxidante de sus mitocondrias.

Una menor eficiencia en la fosforilación oxidativa podría explicar tanto el mayor estrés oxidativo como el mayor potencial de membrana observados en los modelos deficientes en caveolina-1. Se ha descrito que el incremento de colesterol libre mitocondrial reduce la eficiencia de la actividad ATP-sintasa [664-666] y que una elevada ratio mitocondrial de ATP/ADP inhibe la cadena respiratoria para reducir el potencial de membrana mitocondrial y, como consecuencia, la producción de estrés oxidativo [667]. Por lo tanto, una producción de ATP menos eficiente en células deficientes en caveolina-1 podría ser la causa del incremento de potencial de membrana y estrés oxidativo detectados. En este sentido hemos observado un mayor *proton leak* en células deficientes en caveolina-1 y una menor eficiencia respiratoria en mitocondrias aisladas de éstas, indicando una menor eficiencia en la producción de ATP en estos modelos. En concordancia con estos resultados, posteriormente se ha demostrado que la sobreexpresión de caveolina incrementa el acoplamiento de la cadena respiratoria con la fosforilación oxidativa y reduce la producción de ROS en un modelo muscular [668].

Nuestro grupo, en colaboración con el grupo del Dr. José Carlos Fernández-Checa, también demostró que el incremento en colesterol mitocondrial causado por la falta de caveolina-1 disminuye el transporte del antioxidante glutatión des-

de el citosol (datos no mostrados, [587], Anexo), de acuerdo con lo que sucede en otras situaciones con mayor colesterol mitocondrial [607]. Además, también se ha observado un incremento de ROS debido a un mayor colesterol mitocondrial en tratamientos prolongados de insulina, donde correlaciona con un menor nivel de glutatión reducido [669]. En algunos casos se ha descrito que el estrés oxidativo inhibe el metabolismo oxidativo [582], por lo que no podemos descartar que la incapacidad de adaptación a la activación del metabolismo mitocondrial con DCA sea una consecuencia del mayor contenido de ROS en la mitocondria causado por la menor entrada de glutatión.

En conclusión, el mayor estrés oxidativo podría ser causado por la menor eficiencia en la fosforilación oxidativa, por la menor entrada de glutatión reducido, o por ambos mecanismos simultáneamente.

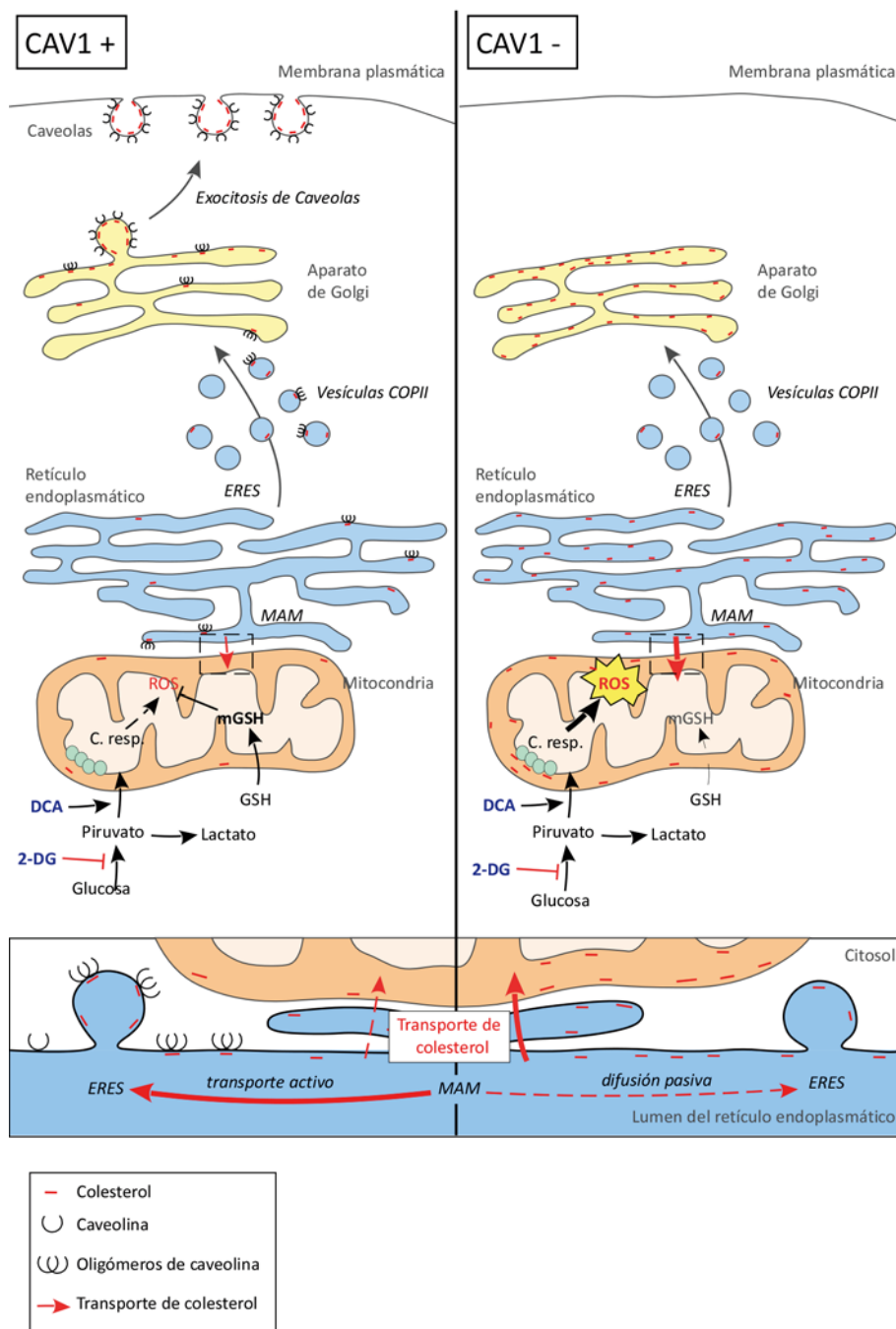
Independientemente de su causa, el estrés oxidativo observado en las células deficientes en caveolina-1 provoca una mayor susceptibilidad a la apoptosis, tanto al activar el metabolismo mitocondrial con 2DG o DCA, como en respuesta a inductores de la apoptosis como el  $TNF\alpha$ . Aunque recientemente se ha sugerido que la deficiencia en caveolina-1 sensibiliza a los hepatocitos a la apoptosis reduciendo la expresión de proteínas antiapoptóticas [670], la apoptosis observada en nuestros estudios sería causada, al menos parcialmente, por el estrés oxidativo, dado que es inhibida al tratar con antioxidantes.

Probablemente como consecuencia de la disfunción mitocondrial observada, las células deficientes en caveolina-1 son más dependientes del metabolismo glucolítico, hecho que podría explicar que los animales deficientes en caveolina-1 requieran una elevada glucosa en sangre para sostener la regeneración hepática [124, 125]. La preferencia por el consumo de carbohidratos frente a lípidos también se ha confirmado al mantener ratones deficientes en caveolina-1 en jaulas metabólicas [125, 671], y al analizar la supervivencia de hepatocitos aislados en presencia de estos substratos [124]. En este sentido, las células deficientes en caveolina-1 muestran una menor oxidación de AGs y una reducción en la producción de cuerpos cetónicos [672].

## 1.2 Mecanismo por el que la falta de caveolina-1 incrementa el colesterol mitocondrial

Las vías que regulan el transporte de colesterol hacia las mitocondrias son poco conocidas, la falta de caveolina-1 podría incrementar el colesterol mitocondrial por diferentes mecanismos. Dado que en algunos estudios ha sido detectada en las mitocondrias [668, 673], la caveolina podría regular la salida de colesterol de las mitocondrias mediante la unión directa del colesterol en este orgánulo. En nuestros estudios no hemos detectado caveolina-1 en mitocondrias purificadas de hígado, por lo que no favoreceríamos esta hipótesis. Recientemente se ha postulado que el colesterol podría llegar a las mitocondrias por las regiones en que éstas interactúan con el RE, las MAM (*mitochondrial associated membranes*) [674]. La caveolina-1 se ha detectado en estas regiones [675], donde además, resultados posteriores del grupo muestran que se encuentra enriquecida (datos no mostrados). Así, mediante el control de los niveles de colesterol en las MAM, la caveolina podría regular el colesterol mitocondrial. Como se ha comentado en la Introducción, la caveolina une colesterol y promueve el transporte del colesterol de nueva síntesis desde el RE a la membrana plasmática [606, 676]. En concordancia con este papel, nuestro grupo ha observado una menor secreción de colesterol y una acumulación de esta molécula en el RE y el aparato de Golgi en células deficientes en caveolina [110]. Además, la falta de caveolina en células esteroideogénicas incrementa la síntesis mitocondrial de pregnenolona, indicando un mayor transporte de colesterol desde el RE hacia las mitocondrias probablemente a través de las MAM para la síntesis de esta hormona precursora [677].

Como conclusión, la deficiencia de caveolina-1 reduce la salida de colesterol del RE hacia la membrana plasmática e incrementaría el colesterol mitocondrial, probablemente a través de las MAM. El aumento de colesterol provoca una deficiencia mitocondrial con un incremento de estrés oxidativo que sensibiliza a las células frente a la apoptosis y promueve la dependencia del metabolismo glucolítico de estas células (Esquema 1 de la Discusión, basado en [110]).



Esquema 1. Esquema de los efectos de la caveolina-1 sobre el transporte de colesterol hacia la mitocondria. Basado en Bosch *et al.* Traffic 2011.

### 1.3 Consecuencias fisiológicas de la deficiencia de caveolina-1

Las mitocondrias son orgánulos con un contenido de colesterol muy reducido. Aun así, los datos mostrados revelan que un pequeño incremento en este puede provocar alteraciones que comprometan la viabilidad celular en determinadas circunstancias.

Nuestro grupo [587] (Anexo), en colaboración con el grupo del Dr. José Carlos Fernández-Checa y el grupo de la Dra. Ester Pérez Navarro, también demostró que la disfunción mitocondrial causada por la deficiencia en caveolina-1 incrementa la susceptibilidad a la apoptosis en diferentes modelos de enfermedades. Los ratones deficientes en caveolina-1 son más susceptibles a la esteatohepatitis inducida por la inyección de Jo2 y a la muerte neuronal causada por la inyección de ácido 3-nitropropiónico, una toxina mitocondrial usada como modelo de la enfermedad de Huntington [678]. Además, las mitocondrias aisladas de cerebro de ratones deficientes en caveolina-1 tienen un mayor estrés oxidativo inducido por el péptido Ab1-42, característico de la enfermedad de Alzheimer y con una toxicidad mitocondrial demostrada [679]. Estos resultados confirman las consecuencias funcionales del mayor colesterol mitocondrial causado por la deficiencia de caveolina-1, y la disfunción mitocondrial resultante, en enfermedades ampliamente extendidas como la esteatohepatitis y enfermedades neurodegenerativas.

En consonancia con estos resultados, se ha descrito que la falta de caveolina acelera la neurodegeneración [680], y un mayor colesterol mitocondrial incrementa la neurotoxicidad causada por el péptido  $\beta$ -amiloide en la enfermedad de Alzheimer [609]. Además, se ha observado un mayor colesterol mitocondrial en mitocondrias de hígados de ratones obesos donde incrementa la susceptibilidad a la esteatohepatitis [607] y recientemente se ha relacionado la obesidad con enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson o el Alzheimer [681-685]. Estos hechos permiten anticipar que los resultados obtenidos en los modelos deficientes en caveolina-1 podrían ser extensibles a los efectos del síndrome metabólico, donde la acumulación de colesterol mitocondrial podría hacer más susceptibles a las personas obesas a padecer esteatohepatitis o enfermedades neurodegenerativas.

En conclusión, la disfunción mitocondrial observada podría explicar la multitud de enfermedades de diferente índole relacionadas con mutaciones de la ca-

veolina-1 en humanos, como distrofia muscular, cáncer de mama, o lipodistrofias [548, 590-596, 686] o relacionadas con la ausencia de esta proteína en modelos animales como cáncer, fallo cardíaco, aterosclerosis, enfermedades neurodegenerativas, resistencia a la insulina y enfermedades vasculares [108, 133, 687-689].

# ESTUDIO DE LA BIOGÉNESIS DE CUERPOS LIPÍDICOS Y EL PAPEL DE ACSL3 EN ESTE PROCESO

En este apartado describimos el péptido HPos como un buen marcador de los CLs, que permite seguir el proceso de biogénesis de estos orgánulos en el RE en respuesta a AGs, debido a su temprana localización en CLs.

## 2.1 El péptido HPos es un buen marcador de la biogénesis de CLs

El péptido HPos está formado por la secuencia hidrofóbica de ALDI y los últimos 20 aminoácidos de la caveolina-1 (cargados positivamente). Esta secuencia positiva permite la rápida segregación del péptido en el RE hacia los lugares de formación de los CLs en respuesta a AGs. La sustitución de las cargas positivas de dicha secuencia (péptido HNeu) inhibe su localización en CLs, ubicándose exclusivamente en el RE.

Como modelo de biogénesis en este trabajo, en células COS-1, usamos la depleción de suero y posterior tratamiento con AGs, dado que así aseguramos que los CLs observados sean de nueva formación.

La localización del HPos en los CLs nacientes es muy temprana e incluso previa a la acumulación de lípidos en éstos y al reclutamiento de proteínas como Plin2/ADRP o Plin3/TIP47, previamente propuestas como marcadores de CLs en formación. Además, HPos no modifica el proceso de biogénesis, por lo que lo consideramos una buena herramienta para estudiar las primeras etapas de la biogénesis de CLs.

El uso de éste marcador permite evaluar la secuencia de incorporación de proteínas a los CLs y, además, al permitir la detección de los CLs en etapas muy tempranas de su formación, este marcador se puede usar para analizar el efecto de la eliminación de determinadas proteínas específicamente sobre la biogénesis de CLs de forma separada de la maduración de CLs y de su metabolización.



## **2.2 El péptido HPos revela la existencia de CLs pre-existentes y la formación de CLs emergentes en el RE**

El uso del HPos nos ha permitido observar la existencia de microdominios en el RE con un núcleo de lípidos neutros en situación de ayuno, que, al contrario de los CLs maduros serían resistentes a la eliminación de los lípidos del medio. Hemos llamado a estas estructuras CLs pre-existentes (pre-CLs). La llegada de lípidos promueve la formación de nuevos microdominios, a los que llamamos CLs emergentes (em-CLs).

La resistencia de los pre-CLs al ayuno de suero nos lleva a pensar que durante las primeras etapas de biogénesis, los CLs podrían no ser reconocidos por las lipasas que los metabolizan. En nuestro grupo se ha demostrado que los pre-CLs acumulan lípidos de forma muy rápida y previa a la formación de em-CLs (datos no mostrados, [588] Anexo), aunque el número de pre-CLs es muy inferior al de em-CLs.

Así, estos pre-CLs podrían representar un primer sistema de acumulación rápida de lípidos, aunque la cantidad de lípidos acumulada sería pequeña, por lo que sería necesaria la nucleación de nuevas estructuras (em-CLs). Otra posibilidad sería que estas estructuras estuvieran implicadas en funciones de los CLs independientes del metabolismo de lípidos como el almacén y degradación de proteínas (ver Introducción) o la lucha contra infecciones [344], permitiendo que las células realicen estas funciones incluso en ausencia de lípidos extracelulares.

Por lo tanto, al recibir AGs del exterior, la célula inicialmente los acumularía en pre-CLs y seguidamente se promovería la formación de múltiples em-CLs. En respuesta a AGs se formarían sucesivas rondas de em-CLs. Dado que el tamaño de los CLs maduros es constante en estas células y el número de em-CLs presentes a la vez en la misma célula parece ser también constante (datos no mostrados, [588] Anexo), la concentración de AGs determinaría el número final de CLs regulando el número de rondas de nucleación de em-CLs durante el tiempo de tratamiento.

El uso de HPos y HNeu nos ha permitido observar que los CLs se forman básicamente en los túbulos periféricos del RE y se mantienen asociados a éste durante todo el proceso de biogénesis. Además, en colaboración con el grupo del Prof. Robert G. Parton ([588 Anexo, 690]) hemos observado continuidad de membrana

entre el RE y la monocapa de los CLs. La continuidad de membrana con el RE permitiría el rápido reclutamiento por difusión lateral de proteínas ancladas a esta membrana como el HPos a los CLs. Por lo tanto, los datos presentados apoyan el modelo de formación de los CLs por acumulación de lípidos en la bicapa del RE. Además, no se observaron CLs separados del RE al finalizar el proceso de biogénesis, por lo que postulamos que la interacción con este orgánulo podría mantenerse a lo largo de toda la vida del CL.

## 2.3 La biogénesis de los CLs es un proceso secuencial y sincronizado

En el proceso de biogénesis de CLs se ha propuesto que las proteínas se incorporarían de forma secuencial [611]. Inicialmente se incorporaría Plin3/TIP47 y posteriormente Plin2/ADRP. En adipocitos, posteriormente Plin1/perilipina desplazaría finalmente a éstas. En nuestro grupo hemos corroborado este modelo mediante el uso de HPos, la incorporación del cual es anterior a la de dichas proteínas.

Una duda frecuente al describir la localización en CLs de determinadas proteínas es el elevado grado de interacción con el RE de los CLs. El uso de los péptidos HPos y HNeu podría ser una herramienta útil para discernir si una proteína se encuentra efectivamente en los CLs o en el RE circundante; en este último caso la colocalización sería mayor con el péptido HNeu (para ejemplo ver Figura 5I).

Este análisis demostró que, en nuestras condiciones, DGAT2 (implicada en la síntesis de TAG) no se localizó en los CLs sino en el RE circundante, aunque la conjugación con un *tag* podría estar afectando a su localización [55]. En el caso de PEMT (implicada en la síntesis de PC) y ACAT (implicada en la síntesis de CE) también muestran una localización exclusiva en el RE. Entre las proteínas analizadas, que participan en el metabolismo de lípidos, sólo ACSL3 estaba localizada en los CLs, tal como se había descrito previamente mediante análisis proteómicos (ver Introducción) o utilizando un fragmento de esta proteína [158].

En este estudio observamos un reclutamiento más rápido de las proteínas o péptidos que llegan a los CLs desde el RE (ACSL3 y HPos) que de aquellas que lo hacen desde el citoplasma (Plin2/ADRP y también Plin3/TIP47 (datos no mostrados)). Así, posiblemente, durante la biogénesis de CLs inicialmente se recluten

proteínas por difusión lateral desde el RE y posteriormente estas estructuras sean reconocidas por proteínas citosólicas.

La incorporación de ACSL3 a los CLs es simultánea a la del propio HPos, siendo por lo tanto previa a la acumulación de lípidos y proteínas como Plin3/TIP47 y Plin2/ADRP, reclutadas en estadios iniciales de la biogénesis.

Estos datos, junto al hecho que la mayoría de reacciones de formación de TAG requieren de acil-CoA (producido por las ACSL), nos llevaron a estudiar el posible papel de ACSL3 en la formación de los CLs en respuesta a AGs.

## **2.4 ACSL3 es necesaria para la acumulación de CLs**

El efecto inhibitorio de la triacsina C sobre la acumulación de CLs (ver Introducción), confirmado en esta tesis en diferentes tipos celulares, demuestra que las isoformas de ACSL sensibles a esta droga (esencialmente ACSL1, 3 y 4) son claves para la acumulación de CLs en respuesta a AO. La reducción de la expresión de ACSL3 disminuye de forma muy importante la actividad ACSL sobre el ácido oleico, tanto en células COS-1 como en Huh7.

Destacando la relevancia de ACSL3 en la acumulación de CLs en respuesta a AO en fibroblastos, su sobreexpresión incrementa tanto la formación como la acumulación de CLs mientras que la reducción de su expresión las disminuye. Por otro lado, la modificación de la expresión del resto de isoformas de ACSL sensibles a triacsina C no afecta la cantidad de CLs, por lo que ACSL3 sería la isoforma más relevante para mediar este efecto.

En contraste con estos resultados, en células hepáticas se ha descrito el efecto opuesto de ACSL3 en la acumulación de CLs [181, 182]. Cabe tener en cuenta que en estos casos los autores no inducen la formación de CLs con AGs exógenos, de modo que la biogénesis de CLs en respuesta a AGs sería menos activa. Por otro lado, ACSL3 se ha implicado en la  $\beta$ -oxidación (ver Introducción). Dado que la  $\beta$ -oxidación en células hepáticas es mucho más activa que en células COS-1, la inhibición de ACSL3 en células hepáticas podría incrementar el contenido de CLs a través de la inhibición de la  $\beta$ -oxidación, mientras que en fibroblastos reduciría el contenido de CLs a través de su efecto sobre la biogénesis. Así, dado que estaría implicada en procesos tanto anabólicos como catabólicos de

CLs, la reducción de ACSL3 tendría diferente efecto según la vía más activa en cada tipo celular y situación metabólica.

## 2.5 La actividad de ACSL3 depende del dominio *Gate*

Un posible papel de ACSL3 en la biogénesis de CLs podría ser mediante la producción de acil-CoA (precursor de la síntesis de glicerolípidos) en los microdominios de formación de CLs y en los CLs maduros, facilitando la síntesis local de TAG y por lo tanto el engrosamiento de éstos.

En esta tesis demostramos que el dominio *Gate* es esencial para la actividad de ACSL3, del mismo modo que lo es para ACSL6 o las isoformas bacterianas [612]. Una ACSL3 sin este dominio (ACSL3 $\Delta$ gate), y por lo tanto sin actividad, tiene una menor capacidad de incrementar la acumulación de CLs maduros que la forma *wt*.

Estos datos, junto con la inhibición completa de la acumulación de CLs mediante triacsina C, nos permiten postular que la acumulación de lípidos en CLs a largo plazo depende en gran parte de la actividad enzimática de ACSL3. Cabe tener en cuenta que el mutante ACSL3 $\Delta$ gate parece localizarse en mayor proporción en el RE con respecto a los CLs que la forma *wt*, hecho que podría ser relevante para su función en la acumulación de CLs una vez éstos se estructuran como orgánulos independientes.

## 2.6 Posible función de ACSL3 independiente de su actividad

Aunque la actividad ACSL es importante para la acumulación de CLs, la sobreexpresión de ACSL3 $\Delta$ gate también es capaz de incrementar la biogénesis de CLs durante los primeros minutos de tratamiento con AGs y también, parcialmente, la acumulación de CLs a largo plazo [588] (Anexo). Estos resultados sugieren un papel en la biogénesis de CLs de ACSL3 independientemente de su actividad, especialmente durante las primeras etapas de este proceso.

El modo por el que ACSL3 mediaría este mecanismo independiente de su

actividad queda por esclarecer. La propia estructura de ACSL3, mediante sus hélices anfipáticas podría provocar la curvatura de membrana necesaria para estabilizar los acúmulos de TAG en el RE. Otra interesante posibilidad es el papel de ACSL3 como proteína de anclaje de otras proteínas implicadas en la biogénesis de CLs. ACSL3 interacciona con espartina/SPG20 o AUP-1, que a su vez interaccionan con muchas otras proteínas como Plin3/TIP47 [212, 691] y regulan la actividad del proteasoma en los CLs. Como se ha comentado en la Introducción, la actividad del proteasoma regula la presencia en los CLs de proteínas clave para su maduración como Plin2/ADRP (ver Introducción).

Además, ACSL3 también interacciona con enzimas implicadas en la síntesis de lípidos neutros [46] y regula la actividad de factores de transcripción clave en el metabolismo lipídico como PPAR- $\gamma$ , ChREBP, SREBP-1c y LXR- $\alpha$  [185], por lo que los microdominios enriquecidos en ACSL3 podrían funcionar como sensores celulares de la cantidad de lípidos.

Como conclusión, postulamos que ACSL3 tendría un papel dual en la acumulación de CLs, promoviendo la formación de CLs de manera dependiente e independiente de su actividad enzimática. Esta proteína ejercería un papel independiente de su actividad especialmente durante las primeras etapas de la biogénesis de CLs, mientras que su actividad permitiría la síntesis local de acil-CoA, posiblemente más importante durante la maduración de los CLs.

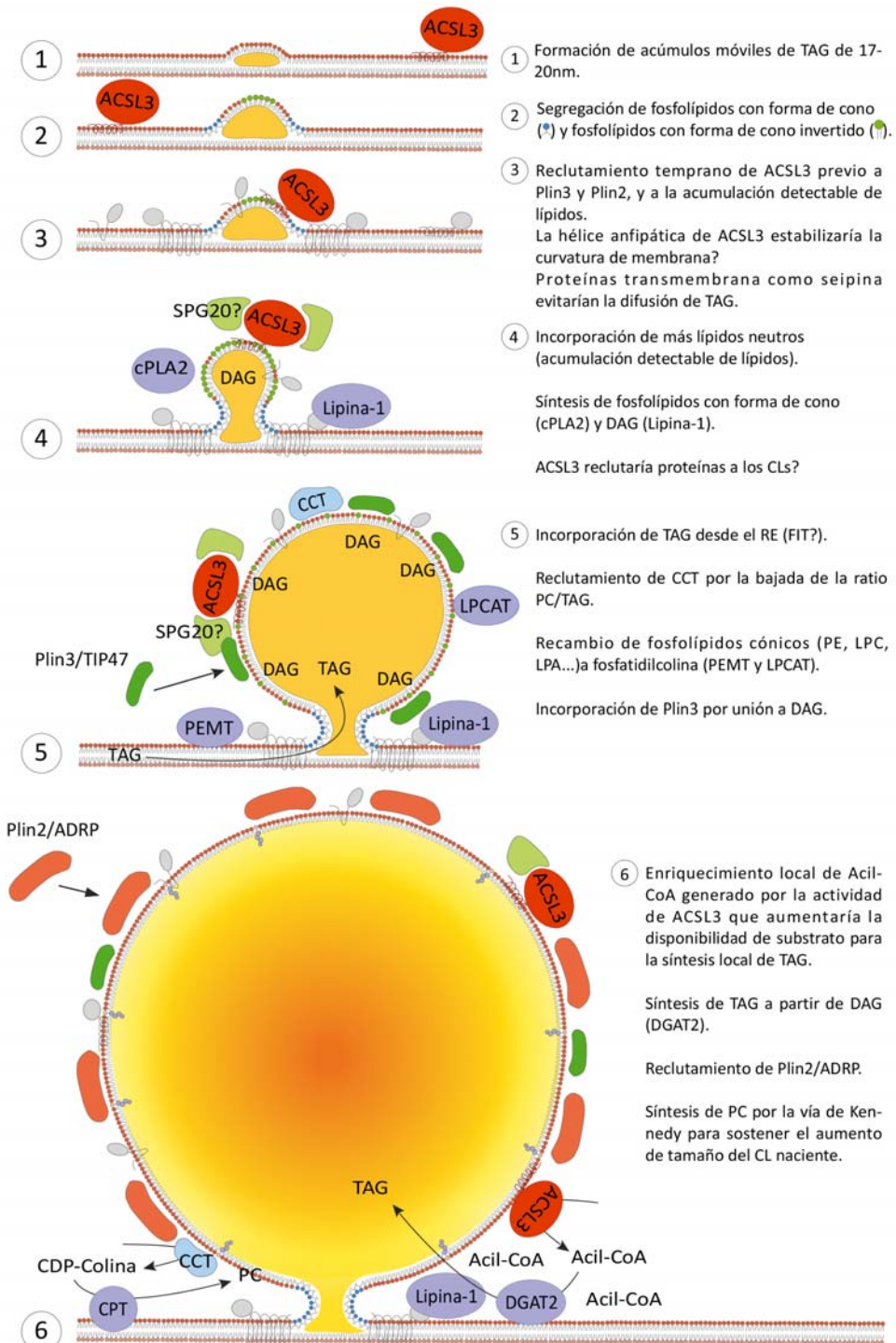
## **2.7 Implicaciones de ACSL3 en el modelo de biogénesis de CLs**

Los resultados obtenidos en este apartado apoyan el modelo que propone que la formación de CLs es un proceso altamente sincronizado, que ocurriría en las membranas del RE y sería iniciado por la llegada de ácidos grasos (Esquema 2, basado en [690]).

Según este modelo, los TAG sintetizados por enzimas residentes en el RE serían depositados en forma de glóbulos en el interior de la bicapa. Estos glóbulos, con un diámetro de aproximadamente 20nm, serían altamente inestables y probablemente se moverían lateralmente en la membrana. Los TAG pueden acumularse en el RE sin formar CLs [228, 234] por lo que la biogénesis de CLs requiere en este punto de sistemas de nucleación adicionales. El hecho que la actividad

PLA y PLD es necesaria durante la biogénesis de CLs *in vivo* e *in vitro* sugiere que la acumulación de lisofosfolípidos provocaría la curvatura de la membrana del RE. Esta curvatura podría ser reconocida por proteínas que residen en la cara citosólica del RE y contienen hélices anfipáticas, como ACSL3. La proximidad de estas proteínas con los glóbulos de TAG en formación en el RE permitiría el rápido reclutamiento de éstas y sus hélices reconocerían eficientemente la curvatura de membrana. Esta interacción podría estabilizar la estructura nascente y determinar el nacimiento del CL.

Los CLs nascentes podrían acomodar otros glóbulos móviles de TAG que llegaran lateralmente. Además la acumulación temprana de ACSL3 en los CLs nascentes provocaría un enriquecimiento local de acil-CoA, haciendo que las enzimas encargadas de la síntesis de lípidos que se encuentren cerca, y que precisan de acil-CoA como sustrato, fueran especialmente activas en los lugares de formación de CLs. Estas enzimas, además forman complejos entre sí [46] promoviendo la síntesis local de TAG, hecho que se traduciría en el rápido crecimiento del CL nascente. Simultáneamente, el enriquecimiento en especies intermediarias en la síntesis de TAG como DAG o ácido fosfatídico reclutaría proteínas como Plin3/TIP47 y regularía la curvatura de membrana. Proteínas completamente transmembrana como seipina o FIT, se situarían en regiones cercanas del RE y evitarían la salida de lípidos del glóbulo, aunque no la entrada de fosfolípidos sintetizados en estas regiones del RE. La fosfatidilcolina, el fosfolípido mayoritario de los CLs, sería generada en la base de esta estructura mediante la vía de Kennedy y la actividad de CCT en el CL. Además, nueva fosfatidilcolina sería sintetizada localmente en el CL mediante la actividad LPCAT a partir de los lisofosfolípidos acumulados inicialmente o por conversión, en adipocitos y hepatocitos, de fosfatidiletanolamina mediante la acción de PEMT. La fosfatidilcolina generada sería necesaria para el crecimiento de la estructura, para evitar la fusión con otros CLs y para impedir el acceso de las lipasas citosólicas al CL en formación. Posteriormente a la acumulación detectable de lípidos, Plin2/ADRP se reclutaría en los CLs desde el citoplasma, estabilizando el CL.



Esquema 2. Posibles papeles de ACSL3 en el modelo de biogénesis de CLs en el RE.

Basado en Pol *et al.* JCB 2014.



# ANÁLISIS DE LOS FACTORES QUE REGULAN LA ACUMULACIÓN DE CUERPOS LIPÍDICOS

## 3.1 Factores que modulan la acumulación de CLs en distintos modelos celulares

En este apartado de la tesis analizamos los factores que afectan a la acumulación de CLs en tipos celulares de metabolismo diferente.

### 3.1.1 Las células AML12 acumulan más CLs

La acumulación de CLs es distinta entre tipos celulares. Nuestros resultados demuestran que hay células capaces de almacenar una mayor cantidad de CLs que otras. Por ejemplo, en respuesta a AGs, las células hepáticas usadas en este estudio (AML12) acumulan más CLs que los fibroblastos (Vero) o células de origen muscular (C2C12). Sin embargo, esta mayor acumulación de CLs no se corresponde ni con una mayor capacidad de biogénesis, ni con una mayor captación de AGs, ni con una mayor síntesis *de novo* de AGs. Aunque la actividad de las vías metabólicas que determinan el consumo de CLs afecta la acumulación de estos orgánulos, la mayor acumulación de CLs en las células AML12 tampoco se corresponde con una menor actividad de vías catabólicas como la lipólisis o la  $\beta$ -oxidación, que de hecho son más activas en estas células.

La actividad ACSL es imprescindible para la acumulación de CLs en todos los tipos celulares. Aunque queda por explorar, una posible explicación a la mayor acumulación de CLs en AML12 sería una mayor actividad ACSL que permitiera una incorporación más eficiente de los AGs captados a los CLs en forma de TAG. Este concepto, introducido por el grupo del Dr. Joachim Füllekrug [158], es llamado *metabolic trap* y sería análogo al mecanismo por el que la hexoquinasa fosforila la glucosa captada por la célula impidiendo su salida de ésta. Una *metabolic trap* de lípidos más eficiente en determinados tipos celulares permitiría una mayor formación de CLs con una menor tasa de captación de AGs.



### 3.1.2 El balance entre vías metabólicas modula la acumulación de CLs en diferentes tipos celulares

El conocimiento del metabolismo diferencial de CLs entre diferentes líneas celulares puede ser una información práctica para escoger la línea celular adecuada para estudiar el comportamiento de los CLs en determinadas situaciones metabólicas, así como la función de diferentes proteínas en este proceso. Por ejemplo, una proteína que afecte a la  $\beta$ -oxidación de AGs en situación de abundancia de nutrientes afectará al metabolismo de los CLs de forma diferente en hepatocitos o mioblastos, pudiendo llevar a conclusiones erróneas sobre su función.

#### ***En presencia de AGs la autofagia promovería la biogénesis de CLs y no su consumo***

El efecto de la inhibición de la autofagia sobre el contenido de CLs es controvertido [410, 471, 692]. Hemos observado que esta inhibición, en presencia de AO en el medio, reduce el contenido de CLs en las tres líneas estudiadas. Por lo tanto, los resultados sugieren que en presencia de nutrientes la autofagia participaría de forma más importante en la biogénesis de CLs que en su consumo.

#### ***En presencia de AGs algunas líneas realizan un ciclo fútil de lipólisis basal, que reduce la acumulación de CLs***

Cada vez está más extendida la idea que, al menos en aquellos tipos celulares con un gran metabolismo lipídico como adipocitos, hepatocitos, macrófagos o cardiomiocitos, los CLs están continuamente realizando un ciclo fútil de lipólisis basal y re-esterificación de los AGs (ver Introducción). En coherencia con este hecho, en condiciones de abundancia de nutrientes, la inhibición de la lipólisis promueve la acumulación de CLs en hepatocitos y mioblastos, mientras que prácticamente no se observa un efecto en fibroblastos. Así, este ciclo de lipólisis basal sería más relevante en hepatocitos y mioblastos que en fibroblastos.

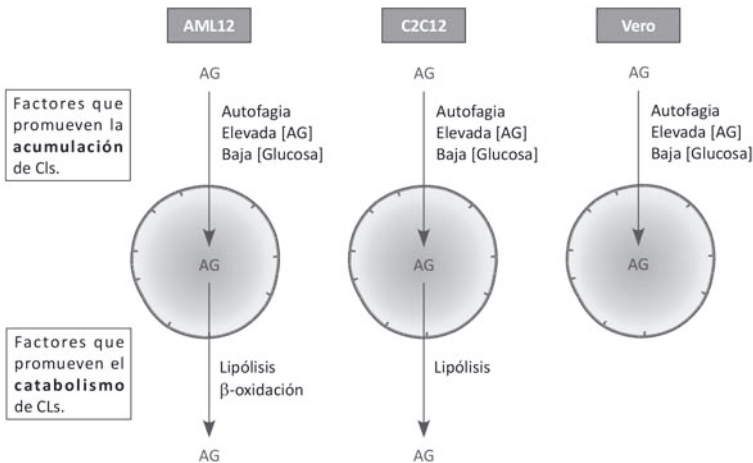
#### ***Las células hepáticas realizan $\beta$ -oxidación basal en presencia de AGs***

La actividad de la  $\beta$ -oxidación en presencia de nutrientes es muy diferente entre las diferentes líneas celulares, siendo mucho más importante en hepatocitos. La inhibición de esta vía pone de manifiesto que en hepatocitos, la  $\beta$ -oxidación

y la síntesis de CLs compiten por el mismo pool de AGs, de forma similar a lo descrito en animales [319], hecho que no sucede en las otras líneas estudiadas en presencia de AO.

***El ayuno de glucosa en presencia de AGs promueve la acumulación de AGs en todas las líneas***

La reducción de la concentración de glucosa en presencia de AGs (situación equivalente al ayuno en mamíferos) incrementa la capacidad de síntesis de CLs sin afectar a la captación de AGs ni a las vías que regulan el metabolismo de los CLs. Una interesante posibilidad que queda por explorar es si la disponibilidad de glucosa afecta de alguna manera la *metabolic trap* comentada anteriormente, aumentando la eficiencia en la acumulación de lípidos.



**Esquema 3. Vías que afectan a la acumulación de CLs en las diferentes líneas.**

Como conclusión la cantidad de CLs depende del equilibrio entre los factores que promueven la acumulación de lípidos, ya sean ambientales (concentración de AGs) o intracelulares (autofagia y actividad ACSL), y los factores que afectan al metabolismo basal de CLs (lipólisis y  $\beta$ -oxidación basales). En los tipos celulares analizados, tan solo difieren los factores que afectan el metabolismo basal de CLs. Mientras que los fibroblastos no realizan ni  $\beta$ -oxidación ni lipólisis basales, los mioblastos tan solo tienen lipólisis basal y los hepatocitos tienen activas ambas vías catabólicas (Esquema 3). El mayor metabolismo basal de lípidos en estas células podría explicar la reducción en el contenido de CLs observada en las células AML12 durante tratamientos más largos de 24h. Curiosamente, la línea celular con mayor acumulación de CLs también es aquella con una mayor actividad de las vías metabólicas de CLs.

## **3.2 Heterogeneidad en la acumulación de CLs en hígado**

Al tratar un cultivo clonal de células con AGs, frecuentemente se observan acumulaciones de CLs muy diferentes entre células vecinas, especialmente en las células de origen hepático. Esta observación nos llevó a preguntarnos el porqué de esta variabilidad y los posibles mecanismos que la regularían.

Aunque se ha descrito la heterogeneidad intracelular de CLs, es decir, la presencia dentro de una misma célula de CLs con diferentes proteínas, o diferente tamaño [43], la heterogeneidad intercelular en el contenido de CLs hasta el momento ha sido muy poco estudiada, a pesar de haberse observado en diferentes modelos como adipocitos en diferenciación, [614, 615], células estrelladas de hígado [501], levadura [376], células tumorales [616] y fibroblastos [117], e incluso en biopsias de hígados humanos [617].

En este apartado de la tesis describimos que las células hepáticas acumulan CLs de forma heterogénea. Esta variabilidad es una característica intrínseca de las células, independiente de la arquitectura del tejido hepático, dado que también se da en hepatocitos en cultivo. El tratamiento con AGs a concentraciones moderadas promueve la acumulación preferencial de CLs en algunas células, generando una subpoblación de células con un gran contenido de CLs respecto al resto de la población, por lo que la acumulación de CLs en el cultivo, a concentraciones moderadas de AGs, además de heterogénea sigue una distribución asimétrica.

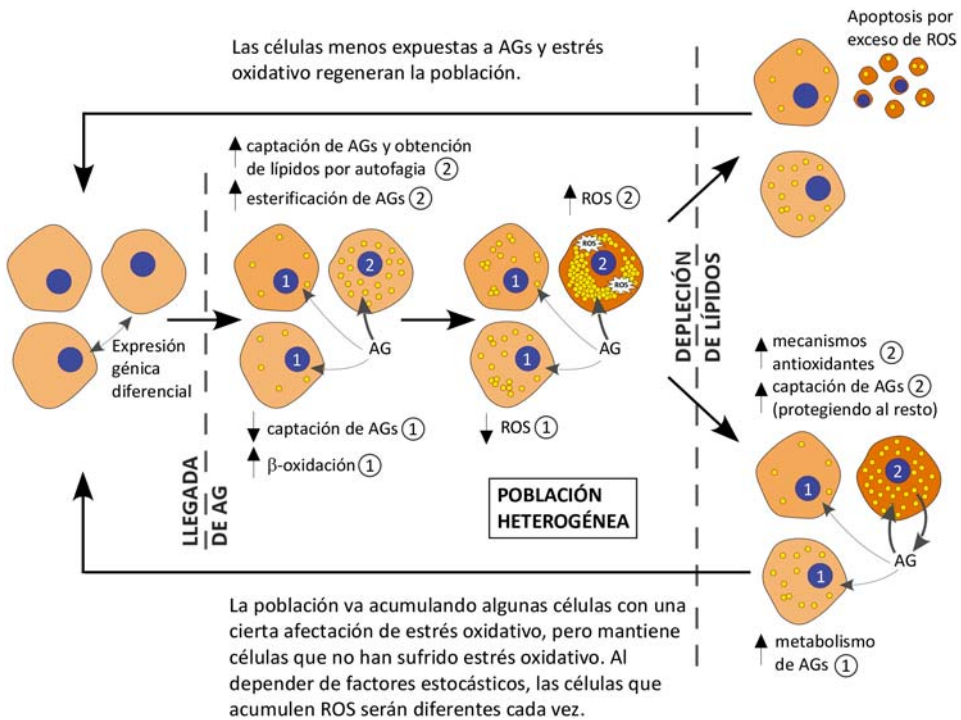
### **3.2.1 La heterogeneidad en la acumulación de CLs protege las células de la lipotoxicidad**

La compartimentación del almacén de lípidos es una característica conservada evolutivamente, que en mamíferos ha llevado al desarrollo de un tejido adiposo formado por células especializadas en esta función. Esta compartimentación protege al resto de células del organismo de la lipotoxicidad causada por los AGs y cuando se queda alterada, como sucede en determinadas lipodistrofias, el resto de tejidos sufren de lipotoxicidad y resistencia a la insulina.

En este trabajo postulamos que la acumulación de una gran cantidad de CLs en una subpoblación de células del cultivo es una ventaja poblacional, dado que

solo unas pocas células se exponen a una lipotoxicidad elevada, quedando el resto más protegido. Las células con mayor acumulación de CLs siguen captando más AGs provocando que las células con menor contenido de CLs acumulen menos lípidos y generen menor cantidad de estrés oxidativo. Además, posiblemente debido a que aquellas células sometidas a un mayor estrés oxidativo desarrollan mecanismos para luchar contra este estrés, en las poblaciones heterogéneas no sólo las células de bajo contenido en lípidos tienen menos estrés oxidativo, sino que la población en su conjunto es menos sensible a la lipotoxicidad inducida por AGs como el ácido palmítico.

La compartimentación de la lipotoxicidad en un grupo reducido de células permitiría que, en caso de que tal estrés comprometiera la viabilidad celular, estas células murieran por apoptosis y fueran eliminadas del tejido selectivamente (Esquema 4, Opción A). En este sentido se ha demostrado que los lípidos captados por los macrófagos mediante la fagocitosis de restos apoptóticos activan a estas células mejorando la limpieza de restos apoptóticos [329], por lo que la eliminación de restos de células con alto contenido lipídico podría ser más eficiente. Según esta hipótesis, después de cada exposición a AGs algunas células serían



**Esquema 4. Modelo de progresión de la esteatosis hepática en respuesta a concentraciones moderadas de ácidos grasos.**

eliminadas, pero las células restantes siempre mantendrían un menor grado de estrés oxidativo. Esta posibilidad queda por explorar debido a que por cuestiones técnicas no hemos sido capaces de demostrar si aquellas células que hacen apoptosis en el cultivo provienen de la población inicialmente más cargada de CLs.

Apoyando la idea de que una subpoblación de células del cultivo se comportaría circunstancialmente como un tejido adiposo para el cultivo, también demostramos que las células con mayor contenido de CLs tienen la capacidad de suministrar AGs a las células con menos CLs cuando se eliminan los lípidos del medio (Esquema 4, opción B), e incluso que la presencia de células con menos CLs promueve la descarga de las células con más CLs, posiblemente debido a un mayor requerimiento de AGs por parte de las primeras y/o a la existencia de mecanismos de comunicación intercelular. La existencia de un trasvase de lípidos entre células de diferente contenido en lípidos ha sido recientemente demostrada por Nieman y colaboradores. En su estudio estos autores demostraron que el cocultivo con células metastáticas promueve la lipólisis en adipocitos y la liberación de AGs al medio que son captados por las células tumorales y usados para la obtención de energía por  $\beta$ -oxidación [581].

En conclusión, los resultados de este apartado nos permiten postular que las células hepáticas acumulan CLs de forma heterogénea, y que dicha compartimentación de la acumulación de lípidos en un cultivo celular reproduce las funciones de la compartimentación de la acumulación de grasas en el cuerpo, donde el tejido adiposo acumula la mayor parte de lípidos protegiendo al resto de tejidos de la lipotoxicidad y suministrando AGs a éstos en caso de necesidad.

### **3.2.2 La heterogeneidad en la acumulación de CLs estaría causada por la estocástica en la expresión génica**

Al contrario de la compartimentación de lípidos en el cuerpo, la que se da en un cultivo de células hepáticas es reversible, es decir, frente a sucesivas exposiciones a AGs, las células que acumulan mayor cantidad de CLs no serán siempre las mismas. Por otro lado, la reducción de la heterogeneidad al inhibir la síntesis proteica, indica que la expresión génica diferencial durante la exposición a AGs causa diferencias en el contenido de CLs entre células vecinas.

Ambos conceptos permitirían postular que la estocástica de la expresión génica regularía la heterogeneidad en el contenido de CLs. En general, La heterogeneidad fenotípica dentro de una población de células idénticas en respuesta al mismo estímulo suele estar causada por la estocástica en la expresión génica que refleja fluctuaciones de la transcripción y/o traducción de genes y proteínas [619, 693, 694], y permite la adaptación de las poblaciones a entornos cambiantes sin la necesidad de mutaciones irreversibles. Así, la estocástica en la expresión génica permitiría que el contenido de CLs que acumula cada célula no esté predeterminado, y frente a cada exposición a AGs, las células que acumulen más CLs sean diferentes.

### 3.2.3 Factores intracelulares que modulan la heterogeneidad

Hemos visto que la inhibición de vías metabólicas como la lipólisis y la  $\beta$ -oxidación reduce la heterogeneidad tanto en situación basal como al inducir la metabolización de CLs. Por otro lado, la captación de AGs es un proceso altamente heterogéneo. Por lo tanto, proponemos que la estocástica en la expresión de genes que participen en estas vías metabólicas, sería responsable de la heterogeneidad en la acumulación de CLs. Aun así, no podemos descartar la participación de vías de señalización como la de la insulina o PPAR $\gamma$ , que se han implicado previamente en la generación de heterogeneidad en la acumulación de lípidos durante la diferenciación de adipocitos [614, 615].

Cabe destacar que en este contexto, la autofagia en presencia de lípidos favorecería la formación de CLs, como está descrito en [267], mientras que en ausencia de lípidos participaría en el consumo de CLs. Curiosamente, la autofagia tan solo afecta a la heterogeneidad en presencia de AGs, hecho que indicaría que no hay diferencias entre células en la activación de la lipofagia en ausencia de lípidos.

El hecho de que la distribución del contenido de CLs sea además de heterogénea, asimétrica, indicaría la existencia de mecanismos de *feed-back* positivo que potencien la acumulación de CLs específicamente en aquellas células que inicialmente acumulan más CLs. Los AGs promueven la generación de estrés oxidativo y se ha descrito que el estrés oxidativo inhibe la  $\beta$ -oxidación [309, 582, 695], y que, además, la inhibición de ésta promueve la acumulación de CLs (ver

Introducción). Por lo tanto, un posible mecanismo de *feed-back* positivo sería que el estrés oxidativo causado por la mayor captación y acumulación de lípidos en algunas células promoviera una aún mayor acumulación de CLs en éstas mediante la inhibición de la  $\beta$ -oxidación.

### **3.2.4 Heterogeneidad en el contenido de CLs en diferentes contextos fisiológicos**

Además de los factores intracelulares anteriormente mencionados, en un contexto fisiológico, la heterogeneidad también vendría determinada por la disponibilidad de nutrientes. Para simular estas situaciones se realizaron experimentos modificando la concentración de glucosa y ácidos grasos en el medio.

Hasta ahora hemos visto que la acumulación de CLs en células hepáticas es heterogénea en una situación de elevada glucosa y concentraciones fisiológicas de AGs, análoga a la que se encuentra el hígado durante las primeras horas después de la ingesta de alimento. Curiosamente en una situación similar al ayuno, donde se mantienen los AGs y se reduce la disponibilidad de glucosa, la acumulación de CLs en células hepáticas es menos heterogénea. Además, en una situación análoga a la obesidad, donde las células se exponen a elevadas concentraciones de AGs y se mantiene el aporte de glucosa, la heterogeneidad se reduce drásticamente. Por lo tanto, el mecanismo de heterogeneidad protegería los hepatocitos de la lipotoxicidad durante la acumulación moderada de CLs después de cada ingesta, mientras que este mecanismo se vería sobrepasado en situación de obesidad con una gran acumulación de CLs en el hígado.

Por otro lado, también hemos visto que en situaciones donde se promueve la metabolización de los CLs acumulados (en ausencia de lípidos en el medio y acentuándose al eliminar la glucosa), la heterogeneidad aumenta, sugiriendo una metabolización asincrónica de los CLs en la población celular. El incremento de heterogeneidad al promover el consumo de lípidos podría prolongar el aporte de lípidos entre células hepáticas y además, podría explicar la mayor heterogeneidad observada a las 48h de regeneración hepática, donde se promueve la metabolización de los CLs para sostener la proliferación de los hepatocitos [124]. De este modo, los efectos beneficiosos de la heterogeneidad de CLs también se darían durante los procesos que promuevan el consumo hepático de CLs.

### 3.2.5 Implicaciones de la heterogeneidad en la esteatosis hepática

Queda por demostrar que los mecanismos que controlan la heterogeneidad en un cultivo de hepatocitos también regulen este proceso en el hígado *in vivo* y que el mecanismo de protección frente a la lipotoxicidad aquí descrito sea también extensible al modelo *in vivo*.

En caso de que los resultados mostrados en esta tesis sean trasladables al modelo animal, disfunciones en factores que afecten a la heterogeneidad como por ejemplo posibles mutaciones en proteínas implicadas en el metabolismo mitocondrial de AGs o la captación de AGs serían factores de riesgo para enfermedades como la esteatosis hepática no-alcohólica dado que reducirían la heterogeneidad en la acumulación de CLs en el hígado exponiendo a este órgano a una mayor lipotoxicidad después de cada ingesta de alimento. Un probado factor de riesgo para la esteatosis hepática no-alcohólica es la obesidad [696]. Puesto que la exposición a concentraciones elevadas de AGs reduce la heterogeneidad, postulamos que en una situación de obesidad la heterogeneidad en la acumulación de CLs en el hígado se vería reducida, contribuyendo a la patogénesis de esta enfermedad.

La profundización en el estudio de este mecanismo de protección poblacional frente a la lipotoxicidad podría llevar al establecimiento de nuevas estrategias de tratamiento de la esteatosis hepática para evitar su progresión a esteatohepatitis y finalmente en cirrosis y fallo hepático. Por otro lado, puesto que la lipotoxicidad causa resistencia a la insulina, un posible incremento en la heterogeneidad podría repercutir, además, en una mejora en la sensibilidad del hígado frente a esta hormona, afectada en enfermedades como la diabetes de tipo II. De esta manera, estrategias farmacológicas que promovieran la activación de la metabolización de CLs en el hígado, además de reducir la cantidad de lípidos en este tejido, incrementarían la heterogeneidad y, como consecuencia, el efecto protector de ésta sobre la lipotoxicidad.





### EFFECTO DE LA LOCALIZACIÓN DE LOS CUERPOS LIPÍDICOS SOBRE SU METABOLIZACIÓN

En este apartado, usamos células de origen fibroblástico para estudiar el comportamiento de los CLs durante el ayuno de nutrientes. En presencia de glucosa estas células basan su metabolismo energético en la glucólisis hasta lactato, mientras que en ausencia de glucosa activan rápidamente el metabolismo oxidativo mitocondrial. Paralelamente, en ausencia de glucosa, las células dejan de proliferar y, si el ayuno se mantiene, acaban muriendo por apoptosis. En este apartado demostramos que la presencia de CLs retrasa la parada de ciclo celular y la activación de la apoptosis causadas por la ausencia de glucosa en fibroblastos. La menor activación de la AMPK (quinasa activada por el estrés energético) en células con CLs sugiere que la causa del retraso en los efectos del ayuno podría ser la energía aportada por los CLs.

Los resultados indican que, aunque las células consumen los CLs a una velocidad similar tanto en presencia como en ausencia de glucosa, el destino metabólico de los AGs que contienen es diferente. En presencia de glucosa se destinarían mayoritariamente a la síntesis de fosfolípidos, probablemente para aportar fosfolípidos necesarios para sostener la proliferación celular. Por otro lado, en ausencia de glucosa se promovería la  $\beta$ -oxidación mitocondrial de los AGs contenidos en los CLs y su secreción al medio.

En esta tesis postulamos que las diferentes condiciones metabólicas determinan el destino de los AGs modulando la localización de los CLs y su interacción con diferentes orgánulos. Debido al importante papel de los CLs como reservorio energético nos centramos especialmente en el estudio de su dinámica en respuesta al ayuno de nutrientes.

## **4.1 La disponibilidad de glucosa regula la localización y el movimiento de los CLs**

Los resultados presentados indican que la localización de los CLs se modula según la disponibilidad de los diferentes sustratos energéticos. En presencia de ácido oleico los CLs se concentran en la región perinuclear, mientras que en su ausencia, la localización y el movimiento de los CLs depende de la disponibilidad de glucosa.

### ***La disponibilidad de AGs y glucosa regula el movimiento de los CLs***

Se ha descrito que los CLs realizan dos clases de movimiento; movimientos saltatorios (rápidos y direccionados) y movimientos oscilatorios (ver Introducción). Aun así, hasta el momento se desconocen situaciones que regulen el movimiento de estos orgánulos. Además de corroborar la existencia de ambas clases de movimiento, en este apartado de la tesis demostramos que mientras que en presencia de AO los CLs son completamente estáticos, en su ausencia se convierten en orgánulos muy dinámicos, desplazándose continuamente de forma dependiente de microtúbulos.

Este movimiento está regulado por la disponibilidad de glucosa, puesto que en presencia de ésta los CLs se desplazan a mayor velocidad que en su ausencia. Las diferencias observadas podrían deberse al diferente grado de interacción con las mitocondrias (comentado posteriormente), que podría reducir el movimiento de los CLs, o quizá a la menor producción de energía en situación de ayuno de nutrientes, que podría afectar a la actividad de las proteínas motoras encargadas de su desplazamiento.

### ***La ausencia de glucosa promueve la dispersión de los CLs***

Además de regular el movimiento de los CLs, la disponibilidad de glucosa también determina la localización de éstos. El ayuno de glucosa promueve una importante dispersión de los CLs por todo el citoplasma, mientras que, en presencia de ésta, se mantienen en una zona más central de la célula sin llegarse a dispersar completamente.

La regulación de la localización de los CLs en ausencia del aporte energético

proporcionado por la glucosa pone de relieve la posible relación entre la localización de los CLs y el uso energético de los AGs.

Los resultados presentados concuerdan con un papel principal de los microtúbulos en la localización y el movimiento de los CLs, dado que la despolimerización de los microtúbulos inhibe completamente su dispersión y movimiento en cualquier condición.

## 4.2 La ausencia de nutrientes promueve la interacción entre CLs y mitocondrias

La interacción entre CLs y mitocondrias ha sido observada en múltiples situaciones y se ha propuesto que participa en la metabolización de los AGs de los CLs en las mitocondrias (ver Introducción), aunque está muy poco caracterizada.

En este sentido describimos que la interacción entre CLs y mitocondrias vendría modulada por la situación metabólica de la célula. En ausencia de nutrientes describimos que esta interacción incrementa, y también la  $\beta$ -oxidación mitocondrial de los AGs contenidos en los CLs. Además, tanto la presencia de glucosa como de AGs reducen esta interacción. Por lo tanto, la ausencia de glucosa promueve específicamente la interacción entre CLs y mitocondrias.

En esta tesis hemos caracterizado la dinámica de la interacción entre estos dos orgánulos, hasta el momento poco estudiada. Se han observado interacciones a modo de *kiss and run*, interacciones estáticas estables en el tiempo, CLs que se desplazan a lo largo de mitocondrias, e incluso interacciones tan intensas que se mantienen a pesar del movimiento de los CLs, donde éstos arrastran la mitocondria con la que interaccionan.

Finalmente, del mismo modo que para la dispersión de los CLs, los microtúbulos son esenciales para su interacción con las mitocondrias. Además, también es necesaria la presencia de una red de microtúbulos intacta para la correcta  $\beta$ -oxidación mitocondrial de los AGs de los CLs, poniendo de manifiesto la utilidad de esta interacción para el metabolismo energético.

### **4.3 La actividad mitocondrial modula la dispersión de los CLs**

Curiosamente, parece existir una relación entre la actividad mitocondrial y la dispersión de los CLs. Tanto la inhibición de la fosforilación oxidativa como de la cadena respiratoria, reducen la dispersión y el consumo de los CLs específicamente en ausencia de glucosa, donde el metabolismo mitocondrial es más activo. Este hecho podría sugerir que, en ausencia de glucosa, la dispersión de los CLs necesita de la actividad mitocondrial.

La relación entre la actividad mitocondrial y la dispersión de los CLs queda por esclarecer, pudiendo deberse a la menor producción de ATP necesario para el desplazamiento de estos orgánulos. Además de reducir la dispersión y el consumo de CLs, los tratamientos efectuados para inhibir la actividad mitocondrial también provocan una fragmentación mitocondrial. Se ha descrito que la eliminación de proteínas relacionadas con la fusión mitocondrial como Opa-1 o mitofusina-2, además de provocar la fragmentación mitocondrial, también provoca un incremento en los niveles de TAG [697]. Así, la elongación mitocondrial, que incrementa en ausencia de glucosa, también podría regular el consumo de CLs y a la dispersión de estos orgánulos y explicar los resultados obtenidos con los inhibidores.

Otra posible relación entre la actividad mitocondrial y la dispersión de los CLs podría ser la activación de la AMPK. Recientemente se ha descrito que la actividad mitocondrial es necesaria para la activación de la AMPK en respuesta al ayuno de glucosa: la generación de estrés oxidativo activaría la quinasa LKB1 que a su vez activaría la AMPK [639, 698]. Como comentaremos en el siguiente apartado, la AMPK estaría implicada en la dispersión de los CLs por lo que su activación podría ser el vínculo entre la actividad mitocondrial y la dispersión de los CLs.

Por lo tanto, en ausencia de nutrientes las mitocondrias de algún modo promoverían la dispersión de los CLs para poder interactuar con ellos y usar los AGs que estos contienen para la obtención de energía.

## 4.4 Las quinasas de respuesta a estrés energético regulan la dispersión de los CLs

La AMPK es la principal quinasa activada por el estrés energético, y regula múltiples funciones encaminadas a la obtención de energía, como la activación de la  $\beta$ -oxidación mitocondrial o la autofagia [621, 622, 638].

En esta tesis corroboramos que la AMPK se activa en ausencia de glucosa y además, describimos que su activación promueve la dispersión y el movimiento de los CLs mientras que su inhibición los impide. Además, la inhibición de la AMPK reduce el consumo de CLs en ausencia de nutrientes. Estas evidencias sugieren que la activación de la AMPK en respuesta al ayuno de nutrientes podría promover la dispersión de los CLs y como consecuencia su interacción con las mitocondrias.

Del mismo modo que la AMPK, se ha descrito que la PKA también se activa en respuesta al ayuno de nutrientes, situación que promueve la elongación mitocondrial y la eficiencia en la producción de ATP [633]. En nuestro modelo, la PKA también regularía la dispersión y el consumo de los CLs. Hasta el momento la PKA había sido relacionada con la localización de los CLs en adipocitos y en células en que se sobreexpresa Plin1/Perilipina. En respuesta a isoproterenol, esta quinasa fosforila la serina 492 de la Plin1/perilipina promoviendo la dispersión de los CLs [360, 372]. Dado que nuestras células no expresarían Plin1, específica de adipocitos, nuestros resultados ponen de manifiesto la posible existencia de mecanismos independientes de Plin1 por los que PKA regularía la localización de los CLs.

En conclusión, tanto la AMPK como la PKA participarían en la dispersión de los CLs causada por el ayuno de glucosa. Dado que hasta el momento tan solo la PKA había sido relacionada con la localización de los CLs, los resultados mostrados apuntarían por primera vez a la intervención de la AMPK en la localización subcelular de los CLs.

## **4.5 El ayuno de glucosa modifica la dinámica de los microtúbulos y como consecuencia la localización de los CLs**

Puesto que además de provocar la dispersión de los CLs, la ausencia de glucosa afecta la localización de otros orgánulos como mitocondrias o endosomas tardíos/lisosomas, postulamos que el ayuno de nutrientes podría estar provocando una modificación de la red de microtúbulos en su conjunto, posiblemente a través de la activación de las quinasas AMPK y PKA, y que este hecho podría permitir cambios de localización e interacción entre determinados orgánulos.

Recientemente se ha relacionado la AMPK con la estabilidad y la polimerización de microtúbulos, mediante la fosforilación de proteínas de unión a éstos como CLIP-170 [644, 645], MAP4 [663] o tau [699, 700]. Además, la forma activa de AMPK se asocia a los microtúbulos durante la mitosis [646, 647, 701]. Por otro lado, la PKA participa en la coordinación de los motores moleculares que mueven los gránulos de melanina [702] y en la fosforilación de CLIP-170 [703]. Así, tanto la AMPK como la PKA se han implicado en la dinámica y la polimerización de microtúbulos.

En esta tesis demostramos que el ayuno de nutrientes provoca cambios en la dinámica de los microtúbulos, tal y como se observa al expresar CLIP-170, proteína que reconoce los extremos distales positivos de los microtúbulos en crecimiento. La disminución del número y longitud de las estructuras en forma de “cola de cometa” marcadas con CLIP-170 durante el ayuno, pone de manifiesto un incremento en la estabilidad de los microtúbulos.

En conclusión, los resultados apuntan a una menor dinámica o mayor estabilidad de la red de microtúbulos en situación de ayuno de nutrientes. Dicha estabilidad podría promover la dispersión de los CLs que observamos en respuesta al ayuno de nutrientes, dado que el tratamiento con taxol, que estabiliza los microtúbulos, también promueve la dispersión de los CLs.

## 4.6 Relación entre la modificación postraduccional de los microtúbulos y la localización de los CLs

Los microtúbulos incorporan determinadas modificaciones postraduccionales como la acetilación y la detirosinación que correlacionan con su estabilidad [704, 705] y regulan algunas de sus funciones [653]. La modificación postraduccional de los microtúbulos se ha relacionado con la interacción entre orgánulos, generando poblaciones de microtúbulos por los que se desplazarían determinados orgánulos de forma preferencial. En este sentido, por ejemplo, el RE interacciona preferentemente con mitocondrias por los microtúbulos acetilados y con endosomas por otras clases de microtúbulos [656]. De forma análoga, especulamos que los CLs podrían asociarse a una clase específica de microtúbulos, de manera que determinadas modificaciones postraduccionales regularían la localización de los CLs y su interacción con mitocondrias.

Dado que el ayuno de glucosa y aminoácidos está descrito que promueve la acetilación de microtúbulos [655], analizamos inicialmente el efecto de esta modificación en la localización de los CLs. Hemos demostrado que al ayunar exclusivamente de glucosa también se incrementa la acetilación de microtúbulos. Además, de demostrar por primera vez que la acetilasa de tubulina  $\alpha$ TAT1/MEC17, descrita recientemente [660, 661], es la responsable de la acetilación de los microtúbulos en respuesta al ayuno de nutrientes. A pesar de ello, aunque demostramos que el ayuno de nutrientes induce la acetilación de microtúbulos y que el incremento de la acetilación de microtúbulos mediante TSA promueve la dispersión de los CLs, la inhibición de la acetilación a través de la depleción de  $\alpha$ TAT1/MEC17 no es capaz de inhibir la dispersión de los CLs causada por el ayuno de glucosa. Por lo que la acetilación de microtúbulos y la dispersión de CLs serían dos procesos independientes, ambos activados por el ayuno.

Otra modificación postraduccional importante de los microtúbulos es la detirosinación, es decir, la eliminación de la tirosina del extremo C-terminal de la tubulina por parte de carboxipeptidasas de tubulina. El grado de tirosinación de los microtúbulos depende de la actividad relativa de estas enzimas y las tirosiniligasas de tubulina, capaces de volver a añadir este residuo de tirosina [653]. Aunque la detirosinación de los microtúbulos no promueve su estabilización *per se* [706], los microtúbulos detirosinados son más estables [707] y el grado de tirosinación de los microtúbulos regula la unión de proteínas importantes para la dinámica de los microtúbulos como CLIP-170, CLIP-115 o p150 [708].



Los resultados muestran que la ausencia de glucosa también promueve la detirosinación de los microtúbulos. Aun así, al contrario que en el caso de la acetilación, la detirosinación de los microtúbulos sí sería necesaria para la dispersión de los CLs en ausencia de glucosa. Por lo tanto, la detirosinación de los microtúbulos regula la localización de los CLs.

El efecto de la detirosinación de los microtúbulos sobre la dispersión de los CLs podría responder a un diferente anclaje de las kinesinas. Las kinesinas son proteínas motoras ancladas a microtúbulos que promueven el movimiento de vesículas hacia zonas periféricas y se han relacionado con el movimiento de CLs [709]. Estas proteínas se asocian preferentemente a microtúbulos detirosinados [710, 711], por lo que el efecto de la detirosinación de microtúbulos sobre la localización de CLs podría deberse a un mayor reclutamiento de las kinesinas a los microtúbulos. Curiosamente, se ha descrito que la dispersión de los endosomas de reciclaje también correlaciona con el grado de detirosinación de los microtúbulos y la inhibición de esta modificación reduce el reciclaje de transferrina del mismo modo que la inhibición de las kinesinas [712]. En esta tesis hemos descrito que la detirosinación de microtúbulos incrementa con el ayuno de nutrientes, por lo que esta condición fisiológica también podría estar afectando a otros procesos como el reciclaje de material endocitado de forma constitutiva.

La detirosinación de los microtúbulos también permite el anclaje de los filamentos intermedios a los microtúbulos [713]. Además, se ha descrito que los filamentos intermedios de vimentina regulan el movimiento de las mitocondrias [714], por lo que no podemos descartar que el efecto observado en la distribución de los CLs se deba a un efecto sobre los filamentos intermedios.

Aunque no hemos detectado grandes cambios morfológicos en el conjunto de la red de microtúbulos, sí observamos que el ayuno de glucosa promueve un cambio en la morfología de los microtúbulos detirosinados, desde un patrón radial derivado del centrosoma a un patrón en forma de trama no-centrosomal. La organización de estos microtúbulos en forma de trama podría ser análoga a la organización no-centrosomal de los microtúbulos descrita en células diferenciadas como por ejemplo las células musculares o neuronales [715], y por lo tanto, derivar de la entrada en quiescencia de estas células en respuesta al ayuno de nutrientes. Cabe destacar que recientemente se ha descrito que la AMPK regula la formación de la red no-centrosomal de microtúbulos observada en células epiteliales mediante la fosforilación de la proteína cingulina que promueve la unión de los microtúbulos a las uniones entre células (*tight junctions*) [716]. Por lo tanto,

la AMPK podría promover la reestructuración de microtúbulos hacia una red no-centrosomal que conllevara una mayor estabilidad y un incremento en la detirosinación de los microtúbulos.

En conclusión, hemos visto que tanto las quinasas AMPK y PKA como la detirosinación de los microtúbulos, ambos activados en respuesta al ayuno de nutrientes, regulan la dispersión de los CLs. Aunque queda por comprobar la relación entre ambos efectos, resultados preliminares muestran que la actividad AMPK podría promover tanto la detirosinación de los microtúbulos en respuesta al ayuno, como su reorganización hacia una estructura nocentrosomal. Cabe tener en cuenta que la activación de la AMPK se ha relacionado con una menor detirosinación de los microtúbulos en cardiomiocitos [663] por lo que la relación entre ambos podría no ser directa.

A pesar del papel ampliamente demostrado de la AMPK como regulador de la respuesta celular al estrés energético y su función como regulador de la red de microtúbulos, por el momento, no hemos encontrado en la bibliografía artículos que relacionen ambas funciones de AMPK. Así, de confirmarse estos resultados, este trabajo propone por primera vez un papel de la AMPK como modulador de la red de microtúbulos en respuesta a una demanda energética, afectando a la distribución de los CLs y a su uso con el fin de obtener energía.

## 4.7 Modelo propuesto

En este apartado de la Tesis proponemos que la presencia de CLs permite a los fibroblastos sobrevivir más tiempo al ayuno de nutrientes, gracias al uso de los AGs para la obtención de energía. En estas condiciones, los CLs se dispersan por todo el citoplasma e interaccionan en mayor medida con las mitocondrias, incrementándose la  $\beta$ -oxidación de los AGs que contienen.

En el modelo que proponemos, el ayuno de nutrientes activa las quinasas de respuesta a estrés energético, especialmente la AMPK, que promovería la modificación de la dinámica y estabilidad de los microtúbulos además de su detirosinación. La detirosinación de los microtúbulos en respuesta al ayuno de nutrientes, posiblemente a través de un mayor reclutamiento de kinesinas, promovería una localización más periférica de los CLs, facilitando su interacción con las mitocondrias.



---

# CONCLUSIONES





1 – La caveolina-1 regula los niveles de colesterol mitocondrial. En su ausencia la acumulación de colesterol en la mitocondria reduce la fluidez de la membrana y la eficiencia de la cadena respiratoria incrementando el estrés oxidativo. Esta disfunción provoca una mayor dependencia de la glucosa durante la proliferación celular y una mayor susceptibilidad a la apoptosis causada por estrés energético y toxinas mitocondriales.

2 – Utilizando el péptido HPos como marcador de los lugares de formación de los CLs hemos demostrado que la biogénesis de este orgánulo es un proceso que ocurre de manera secuencial en las membranas del RE. ACSL3 regula las etapas más tempranas de este proceso a través de mecanismos dependientes e independientes de su actividad enzimática.

3 – El contenido celular de CLs está esencialmente determinado por la cantidad de AGs en el medio. A su vez, la cantidad de CLs depende del equilibrio dinámico entre los factores que promueven su acumulación (concentración glucosa, autofagia o actividad ACSL) y aquellos que causan su consumo (lipólisis o beta-oxidación).

4 – En una población de células el contenido celular de CLs es heterogéneo debido a la regulación estocástica de diferentes vías metabólicas. Esta heterogeneidad genera una subpoblación con alto contenido de CLs que reduce la lipotoxicidad del resto de células y les proporciona lípidos, actuando de forma equivalente al tejido adiposo. La heterogeneidad es especialmente evidente entre hepatocitos y podría estar relacionada con la esteatosis hepática.

5 – La falta de nutrientes provoca la dispersión de los CLs desde zonas perinucleares a regiones periféricas. Esta dispersión tiene lugar a través de microtúbulos, incrementa su interacción con las mitocondrias, y facilita la beta-oxidación de los AGs almacenados. Las quinasas AMPK y PKA regulan este proceso probablemente a través de mecanismos que incrementan la detirosinación de los microtúbulos.



---

# MATERIAL Y MÉTODOS







En este apartado se resumen el material y los métodos usados para la realización de los experimentos mostrados. El CD adjunto contiene un documento donde se muestra una versión más detallada de Material y métodos.

## 1. Modelos celulares y proliferación

### 1.1 Líneas celulares usadas

Línea celular	Tipo celular	Especie	Medio de cultivo	Observaciones
3T3L1 CAV1+	Fibroblastos embrionarios, pre-adipocitos	<i>Mus musculus</i>	DMEM 10%FCS	Generadas en el laboratorio de la Dra. Marta Camps mediante la infección de un lentivirus con siRNA control a partir de 3T3L1 (ATCC CL173).
3T3L1 CAV1-	Fibroblastos, pre-adipocitos	<i>Mus musculus</i>	DMEM 10%FCS	Generadas en el laboratorio de la Dra. Marta Camps mediante la infección de un lentivirus con siRNA anti-caveolina a partir de 3T3L1 (ATCC CL173).
AML12 (ATCC CRL2254)	Hepatocitos	<i>Mus musculus</i>	DMEM:Hams (1:1) 10%FCS +ITS (Insulina 5µg/ml/Transferrin a 5µg/ml/Selenio 5ng/ml) +Dexametasona 40ng/ml	Establecidas a partir de hepatocitos de ratones transgénicos por TGF-α. Mantienen la expresión de albumina, α1-antitripsina y transferrina, proteínas de gap-junctions y isoenzima 5 de LDH.
C2C12 (ATCC CRL1772)	Mioblastos	<i>Mus musculus</i>	DMEM 10%FCS	
COS-1 (ATCC CRL-1650)	Fibroblastos de riñón	<i>Cercopithecus aethiops</i>	DMEM 5-10%FCS	Transformadas con el virus SV40
HeLa (ATCC CCL2)	Adenocarcinoma de cervix	<i>Homo sapiens</i>	DMEM 10%FCS	Obtenidas de un adenocarcinoma de cervix de una mujer de 31 años.
HepG2 (ATCC HB8065)	Carcinoma hepático	<i>Homo sapiens</i>	DMEM 10%FCS	Obtenidas de un carcinoma hepático de un hombre de 15 años. Expresan HMGCoA reductasa y TGH hepática.
Huh7 (JCRB0403)	Hepatoma	<i>Homo sapiens</i>	DMEM 10%FCS	Obtenidas de un carcinoma hepático de un hombre de 57 años.
MEF WT (ATCC CRL2752)	Fibroblastos embrionarios	<i>Mus musculus</i>	DMEM 5-10%FCS	Establecidas por <i>three times crisis</i> .
MEF CAV1-/- (ATCC CRL2753)	Fibroblastos embrionarios	<i>Mus musculus</i>	DMEM 5-10%FCS	Establecidas por <i>three times crisis</i> .
Vero (ATCC CCL81)	Epiteliales de riñón	<i>Cercopithecus aethiops</i>	DMEM 10%FCS	

Todos los medios se han suplementado con Penicilina 50U/ml/Estreptomina 50µg/ml (Biological industries); L-Glutamina 4mM y Piruvato 1mM (Sigma) y Aminoácidos no esenciales (1:100 de MEM-Eagle *Non-essential amino acids solution* 100x, Biological industries).

## 1.2 Aislamiento de hepatocitos

Para obtener un cultivo primario de hepatocitos se procedió al aislamiento de hepatocitos de hígados de ratones *wt*. El aislamiento de hepatocitos fue realizado en nuestro grupo por Alba Fajardo tal y como se describe en [587] (Anexo).

(Protocolo detallado en la versión en CD).

## 1.3 Tinción con DDAO-SE para producir células indicadoras

En los experimentos en que se realizan mezclas de poblaciones, una de ellas se tiñe con la tinción covalente DDAO-SE (Cell Trace Far Red DDAO-SE Invitrogen C34553), para posteriormente poderla detectar mediante citometría. Para la tinción de DDAO-SE las células se incuban en suspensión en PBS con DDAO-SE 0,5µM durante 5' a temperatura ambiente en un rotor de tubos.

En estos experimentos se mezclan células no cargadas de CLs, teñidas con DDAO-SE, o bien con células no cargadas sin teñir o bien con células cargadas con una gran cantidad de CLs (tratándolas 24h con una concentración mucho más elevada de la habitualmente usada: 500µg/ml) sin teñir. La mezcla de poblaciones se realiza 1:1 y posteriormente se plantan conjuntamente. Una vez adheridas (al cabo de unas horas) en algunos casos se añade ácido palmítico o ácido oleico quedando a 50µg/ml y se incuba O/N.

Al cabo de 24h se analizó el estrés oxidativo, la captación de AGs o el contenido de CLs con BODIPY 493/503 como se indica en los respectivos protocolos. Las células marcadas con DDAO-SE han sido detectadas en el citómetro excitando con el láser 633nm y recogiendo la emisión con el filtro 660/20.

(Protocolo detallado en la versión en CD).

## 1.4 Contaje celular en cámara de Neubauer

En los experimentos en que se ha analizado la proliferación celular se han contabilizado las células mediante cámara de Neubauer, plantando en cada experimento dos replicas por condición, cada una contada por duplicado.

La tasa de proliferación entre dos tiempos dados corresponde a la ratio entre el número de células en los dos tiempos.

## 1.5 Sincronización de las células en diferentes fases del ciclo

Para descartar el efecto de la presencia de células en diferentes fases del ciclo en un cultivo asincrónico de células AML12 se sincronizaron a diferentes fases del ciclo y se analizó la heterogeneidad en la acumulación de CLs.

La sincronización en fase G0/G1 se llevó a cabo por ayuno de suero durante el tratamiento de 24h con ácido oleico y la sincronización en fase S se realizó mediante el tratamiento de las células con Timidina a 2,5mM también durante las 24h de tratamiento con ácido oleico.

La sincronización se comprobó analizando el perfil de ciclo mediante citometría de flujo (Figura 1 de Material y métodos).

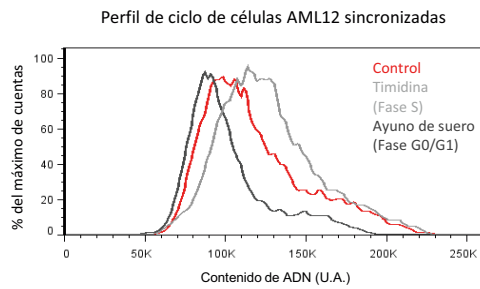


Figura 1. Perfil de ciclo celular de células AML2 en diferentes sincronizaciones.

## 2. Preparación de productos

### 2.1 Drogas usadas y su preparación

Droga	Referencia	Efecto	Observaciones
<b>AICAR</b>	Sigma A9978	Activa la AMPK	Stock 250mM en H <sub>2</sub> O a -20°C.
<b>Antimicina A</b>	Sigma A8674	Inhibe el complejo III de la cadena respiratoria.	Stock 5mM en etanol a -20°C.
Butylated hidroxianisole ( <b>BHA</b> )	Sigma B1253	Antioxidante.	
<b>Cicloheximida</b>	Sigma C7698	Inhibe la síntesis proteica.	Preparar stock 10mg/ml fresco en Hepes 25mM.
<b>Compound C</b>	Sigma P5499	Inhibe la AMPK	Stock 15mM en DMSO a -20°C.
Dicloroacetato ( <b>DCA</b> )	Sigma 347795	Inhibe la PDHK que inhibe la PDH. Promueve el uso mitocondrial del piruvato.	
<b>2-deoxiglucosa (2-DG)</b>	Sigma D8375	Inhibe la fosforilación de la glucosa por la hexoquinasa. Reduce la captación de glucosa.	Preparar fresca en medio un stock 1M.
Diethylumbelliferyl phosphate ( <b>DEUP</b> )	Sigma D7692	Inhibe las lipasas.	Stock 250mM en DMSO a -20°C.
Paraoxon-ethyl ( <b>E600</b> )	Sigma D9286	Inhibe las lipasas.	Stock 181mM en etanol a -20°C.
<b>Etomoxir (ETO)</b>	Sigma E1905	Inhibe la $\beta$ -oxidación.	Stock 50mM en H <sub>2</sub> O a -20°C.
<b>FCCP</b>	Sigma C2920	Desacoplador mitocondrial	Stock 10mM en etanol a -20°C.
<b>Glutación reducido permeable (GSH-EE)</b>	Sigma G1404	Antioxidante	Stock 1M en H <sub>2</sub> O a -20°C.
<b>H89</b>	Sigma B1427	Inhibe la PKA.	Stock 10mM en DMSO a -20°C.
<b>3-metiladenina (3MA)</b>	Sigma M9281	Inhibe la autofagia.	Stock 200mM en H <sub>2</sub> O a -20°C. Calentar a 60°C para disolverlo, tanto al preparar el stock como al tratar.
<b>Nocodazol</b>	Calbiochem 487928	Despolimeriza los microtúbulos.	Stock 15mM en DMSO a -20°C.
<b>Oligomicina</b>	Sigma O4876	Inhibe la ATPsintasa	Stock 4mg/ml en etanol a -20°C.
<b>Parthenolide</b>	Sigma P0667	Inhibe la Tubulina carboxipeptidasa.	
<b>Platensimicina (PTM)</b>	Sigma P0025	Inhibe la lipogénesis.	Stock 2mM en DMSO a -20°C.
<b>Taxol</b>	Sigma T7191	Provoca la estabilización de los microtúbulos.	Stock 15mM en DMSO a -20°C.
<b>Timidina</b>	Sigma T1895	Sincroniza las células en fase S.	Stock 250mM en H <sub>2</sub> O a -20°C.
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	PeptoTech Bionova 300-01A	Pro-apoptótico.	Stock 9 $\mu$ M en H <sub>2</sub> O a -20°C.
<b>Triacsina C (TRC)</b>	SantaCruz sc-200574	Inhibe la actividad ACSL.	Stock 5mM en DMSO a -20°C.
<b>TrichostatinA (TSA)</b>	Sigma T8552	Inhibe las deacetilasas.	Stock 100 $\mu$ g/ml en H <sub>2</sub> O a -20°C.

## 2.2 Conjugación de ácido oleico y ácido palmítico con BSA

### **Ácido Oleico - BSA**

Para una carga de CLs reproducible es muy importante la correcta preparación del stock de ácido oleico con el que se tratarán las células. El ácido oleico se conjuga con BSA a una proporción molar Oleico:BSA 6:1[172].

#### **PROTOCOLO:**

A) Preparar stock 177mM de ácido oleico en etanol. Éste stock se puede guardar un tiempo a  $-20^{\circ}\text{C}$ , aunque se acaba evaporando.

- Pesar 0,1g de ácido oleico (Calbiochem 4954) y disolver en 2ml de etanol.

B) Preparar stock 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$  de ácido oleico conjugado con BSA en medio. Se prepara un stock de ácido oleico 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$  para cada medio diferente usado. Este stock de ácido oleico se puede guardar a  $4^{\circ}\text{C}$  protegido de la luz.

- Disolver completamente mediante vortex 0,5g de BSA *fatty acid free* (Sigma A8806) en 25,68ml del medio en que se quieren hacer los tratamientos y filtrar con filtro de 0,22 $\mu\text{m}$  (nunca después de añadir el oleico).

- Comprobar el volumen de medio final y preparar una dilución 1:100 a partir del stock de ácido oleico 177mM en el medio filtrado. Mezclar con vortex.

- Mantener un mínimo de 1h en agitación (a máxima potencia del agitador) a temperatura ambiente, protegido de la luz.

### **Ácido Palmítico - BSA**

A) Preparar stock de Palmítico 100mM en NaOH 0,1M: (Guardable a  $-20^{\circ}\text{C}$ )

Pesar 0,0256g de ácido palmítico (Sigma P5585) en un vial de cristal. Poner el vial en un baño de agua a  $70^{\circ}\text{C}$  y añadir 1ml de NaOH 0,1M. Disolver el ácido palmítico agitando con una mosca pequeña.

B) Preparar stock de Palmítico 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$  conjugado 6:1 con BSA: (Guardable a  $4^{\circ}\text{C}$ )

Descongelar el stock de Palmítico 100mM a  $70^{\circ}\text{C}$ .

Pesar 0,487g de BSA *fatty acid free* y disolver en 25ml del medio correspondiente. Filtrarlo con un filtro de 0,22 $\mu\text{m}$ .

Añadir 442,5 $\mu\text{l}$  de palmítico 100mM gota a gota mientras se mezcla con un vortex (en caso de que no

se disuelva bien dejar agitando O/N a máxima potencia evitando la exposición a la luz).

### 3. Transfección

#### 3.1 Transfección de ADN en células

La transfección de DNA en esta tesis se llevó a cabo en células COS-1 en el segundo apartado de Resultados, y en células Vero en el último apartado. Esta transfección se realizó usando el sistema de transfección *Effectene Transfection Reagent de Qiagen* (301427) según las especificaciones del fabricante.

En estos experimentos se plantaron 175000 células COS-1 o Vero en una placa de 9cm<sup>2</sup> el día anterior de la transfección.

La cantidad de ADN usada se tiene que ajustar según la eficiencia de transfección de cada plásmido. En nuestro caso, se ha usado 0,6 µg de cantidad total de ADN, en caso de cotransfección de dos

Péptido	Vector	Origen
<b>ACSL3-GFP</b>	pEGFP-C1	Comprado en GenScript y subclonado en un vector pEGFP.
<b>ACSL3ΔGate-GFP</b>	pEGFP-C1	Obtenido delecionando los aminoácidos 314-339 (dominio Gate) de ACSL3 (comprado en GenScript) y subclonado en un vector pEGFP.
<b>ACSL3-myc</b>	pCDNA4/TO	Proporcionado por N. Yamaguchi (Graduate school of pharmaceutical sciences, Chiba, Japón).
<b>ADRP-Cherry</b>	pCherry-C1	Construido a partir del plásmido pEGFP-C1-ADRP proporcionado por J. McLauchlan (Institute of Virology, Glasgow, Scotland).
<b>ALDI-GFP</b>	pEGFP-C1	Sintetizado en nuestro laboratorio [70].
<b>CLIP-170-GFP</b>	pEGFP-C2	Proporcionado por Y.Komarova (Department of Pharmacology, University of Illinois, USA).
<b>DGAT2-GFP</b>	pEGFP-C3	Construido a partir del plásmido pCDNA3-Flag-DGAT2 proporcionado por RV Farese (Gladstone Institute for Cardiovascular Disease, San Francisco, USA).
<b>HNeu-GFP</b>	pEGFP-C1	Sintetizado en nuestro laboratorio mutando a glicina las dos lisinas y la arginina de los últimos 20 aminoácidos de caveolina usados en la construcción del HPos.
<b>HPos-GFP</b>	pEGFP-C1	Sintetizado en nuestro laboratorio a partir del dominio hidrofóbico de ALDI y los últimos 20 aminoácidos de caveolina-1.
<b>HPos-OFP</b>	mOrange	Obtenido subclonando el HPos-GFP en un vector mOrange proporcionado por RY Tsien (Howard Hughes Medical Institute, Chevy Chase, USA)
<b>LC3-GFP</b>	pEGFP-C1	Addgene (Plasmid 21073).
<b>PEMT-GFP</b>	PS100010	Origene RG200787

plásmidos, 0,3 µg de cada (excepto que la expresión de éstos sea dispar, caso en que se aumenta la cantidad del plasmido con menos expresión reduciendo la del otro).

Los plásmidos usados se resumen en la siguiente tabla.

En los experimentos en que se analiza la biogénesis de CLs la transfección se realiza en medio

0,5%FCS y al cabo de 5-6h se cambia el medio por medio sin suero para proceder a la eliminación de los CLs de las células.

En las células transfectadas con siRNA y ADN, la transfección de ADN se realizó 24h después de la de siRNA. (Protocolo detallado en la versión en CD)

### 3.2 Transfección de ADN con lipofectamina

La transfección con Lipofectamina LTX (Invitrogen 15338-100) se ha usado en casos en que se requería una elevada eficiencia de transfección, como en la transfección de ACSL3wt y  $\Delta$ gate para el ensayo de actividad ACSL *in vitro*. La transfección se ha realizado según las especificaciones del fabricante.

La transfección de estos plásmidos se realizó en células COS-1. El día anterior se sembraron 200000 células por placa de 9cm<sup>2</sup>. Para el ensayo de actividad ACSL se requirieron 6 placas de 9cm<sup>2</sup> por condición.

Cuantificada tanto por FACS como por *western blot*, la expresión del ACSL3 $\Delta$ gate es muy inferior a la del ACSL3wt, por lo que añadimos más cantidad de ADN, para igualar la cantidad total de proteína ACSL3 wt y  $\Delta$ gate. (Protocolo detallado en la versión en CD)

Diana del siRNA	Secuencia	Concentración final usada	Casa comercial	Referencia
Non-targetting siRNA #1	(no proporcionada)	-	Thermo scientific	D-001810-01
ACSL3 (Hs)	5'-AACACGCGAGCGATTCATGAA-3'	10nM	Qiagen	Hs_ACSL3_8
	5'-CCGAAGTGTGGGACTACAATA-3'	10nM	Qiagen	Hs_ACSL3_7
	5'-ACCGCGTGAGTTAAGATTAA-3'	10nM	Qiagen	Hs_ACSL3_2
	5'-TAGCTCGAAAGAAAGGACTTA-3'	10nM	Qiagen	Hs_ACSL3_6
AMPK $\alpha$ 1	5'-GAGGAGAGCTATTTGATTA-3'	60nM	Ambion, Life technologies	ADS0688
AMPK $\alpha$ 2	5'-GCTGTTTGGTGTAGGTAAA-3'	60nM	Ambion, Life technologies	ADV13LO
GFP duplex	5'-GGCTACGTCCAGGAGCGACC-3'	-	Dharmacon RNAi Technologies	D-001300-01-20
$\alpha$ TAT1 (Hs)	5'-GAGGCTCATAATGAGGTAGAA-3'	10nM	Qiagen	s_C6orf134_7
	5'-ACCGCACCACCTGGCAATTGA-3'	10nM	Qiagen	Hs_C6orf134_9
	5'-AACCGCCATGTTGTTTATATT-3'	10nM	Qiagen	Hs_C6orf134_5
	5'-CCCGCCGACCCGGAACCACAA-3'	10nM	Qiagen	Hs_C6orf134_6

### 3.3 Transfección de siRNA con lipofectamina

La transfección de siRNAs se ha realizado con Lipofectamina RNAiMAX (Invitrogen 13778-075), según las especificaciones del fabricante. Los siRNAs usados en esta tesis se detallan en la tabla siguiente:

Como siRNA control en algunos casos se ha usado el siGFP (GFP duplex) y en otros siNT (*Non-targetting*) añadiendo la misma cantidad de siRNA control que el total de siRNA (suma de las diferentes secuencias en aquellos casos en que se usan diferentes secuencias para *knockear* una misma diana).



(Protocolo detallado en la versión en CD)

## 4. Microscopía

Todas las fijaciones, lavados y tinciones en los protocolos de microscopía, excepto en las tinciones *in vivo*, han sido realizados en gotas sobre un parafilm extendido sobre la poyata.

El montaje de los cubres se ha realizado en todos los casos en mowiol, lavando los cubres por inmersión con agua antes para evitar la formación de cristales de PBS.

### 4.1 Análisis por microscopía de las células transfectadas

En estos análisis las células COS-1 se han plantado en cubres de cristal y al día siguiente se han transfectado con el ADN correspondiente. Seguidamente, se han tratado como se indica en cada figura y se ha procedido a su fijación y análisis por microscopía confocal.

La fijación se ha realizado con paraformaldehído (*Electron Microscopy Sciences*) al 4% en PBS durante 1h a temperatura ambiente.

Fijar durante 1h es necesario para preservar la integridad de los CLs, menos tiempo de fijación aumenta la cantidad de CLs fusionados artificialmente. Las células se pueden mantener más tiempo en este paso, pudiendo llegar a 3-4h.

En algunos casos estas células han sido previamente tratadas con BODIPY-FLC16 (Invitrogen D-3821) como se explica en la Figura correspondiente. En aquellos casos en que se analiza paralelamente el contenido de CLs se ha procedido a la tinción con Nile red explicada posteriormente.

### 4.2 Detección de CLs por microscopía mediante la tinción de Nile red en células fijadas

El **Nile red** (Invitrogen N1142) es un colorante lipofílico que emite fluorescencia entre 600-700nm cuando se une a lípidos polares y entre 550-650nm cuando se une a lípidos neutros (CLs).

Este protocolo se ha usado en el primer apartado de Resultados, en células COS-1 previamente transfectadas con ADN o siRNA, y en el último apartado de la tesis en células Vero en diversas condiciones, generalmente para el análisis por microscopía de epifluorescencia.

#### PROTOCOLO:

A) Preparación de las muestras:

- Realizar 3 lavados rápidos de PBS en cada cubre.
- Incubar el cubre un mínimo de 1h en paraformaldehído preparado al 4% en PBS, a temperatura ambiente (como se ha comentado en el apartado anterior).
- Realizar 3 lavados rápidos con PBS en cada cubre.
- (Opcional) En algunos casos se ha procedido a la tinción de los núcleos con DAPI en este punto. Realizando posteriormente 3 lavados adicionales con PBS.
- Preparación de la solución de montaje con Nile red:

A partir de un stock de Nile red saturado en acetona (que se puede guardar a -20°C), se hace un vortex y un spin para recoger el sobrenadante (Nile red disuelto en acetona).

Se prepara una dilución 1:1000 de este Nile red en mowiol (hay que pipetear muy rápido dado que la acetona se evapora), es conveniente primero preparar una dilución 1:20 en mowiol (que debe quedar de un color violeta intenso) y luego una 1:50 a partir de ésta que debe ser translúcida con un tono rosáceo.

La correcta preparación de estas soluciones es crítica para reducir el *photobleaching* de la tinción de Nile red al mirarla en el microscopio, y es preferible realizarla evitando la exposición a luz directa.

Preparar la tinción justo antes de usar-la y siempre fresca.

- Montar los cubres en la solución de mowiol – Nile red preparada anteriormente.

Evitar la exposición al calor de los cubres con CLs, el secado de 10' en una estufa de 70° provoca la fusión de los CLs adyacentes generando CLs aberrantes.

#### B) Análisis por microscopía:

Es preferible mirar los cubres en el microscopio el mismo día de la preparación para obtener una mejor morfología de los CLs e intensidad de la tinción de Nile red.

En el análisis mediante microscopía de esta tinción hay que tener en cuenta la diferente emisión del Nile red según los lípidos reconocidos. Como hemos comentado el Nile red emite en amarillo (550-650nm) al reconocer lípidos neutros (CLs) y en rojo (600-700nm) al reconocer lípidos polares (todas las membranas celulares).

En microscopía confocal para detectar los CLs es preferible excitar con el láser 514 nm y recoger la emisión entre 550 y 600 nm.

La mayoría de imágenes de CLs en células fijadas han sido tomadas en un microscopio de epifluorescencia (Leica DMI6000 B) con el objetivo de 63x de inmersión en aceite. En la toma de imágenes se ha usado una corrección gamma de 1.4, que realza la especificidad de la tinción para los CLs.

Los microscopios de epifluorescencia suelen contener básicamente 3 filtros, que recogen la fluo-

rescencia emitida en color azul, verde y rojo. Para el análisis de los CLs es preferible seleccionar el filtro verde, puesto que solo captará parte de la emisión del Nile red asociada a CLs (amarilla) y no la asociada a membranas. (roja) En esta tesis, en algunos casos, también se ha recogido y mostrado la emisión del Nile red en el filtro rojo, correspondiente a las membranas celulares, así como parte de aquella asociada a CLs. Este canal ha sido usado para tener una idea de la forma y el tamaño de la célula permitiendo analizar la distribución de los CLs en el interior de ésta.

La tinción de Nile red tiene un *photobleaching* muy elevado que dificulta el enfoque de las muestras. Es preferible enfocar usando el canal rojo, en que se observa la célula entera (con un tiempo de exposición e intensidad de lámpara bajos y un *gain* elevado) y luego tomar la imagen en todos los canales.

#### C) Cuantificación de la dispersión de CLs:

En el último apartado de Resultados se muestran cuantificaciones de la dispersión de CLs hechas a partir de las imágenes de microscopía de epifluorescencia. Este análisis ha sido realizado de forma similar a Marcinkiewicz et al en adipocitos [376], clasificando las células observadas en 3 clases. Células con CLs agregados en la zona central, células con los CLs dispersos por todo el citoplasma y células con un fenotipo intermedio entre ambos. A continuación se muestra un ejemplo de cada fenotipo:

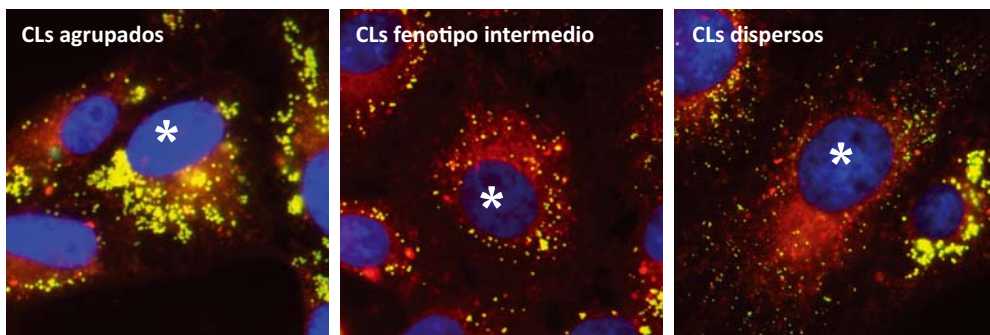


Figura 2. Ejemplos de los diferentes fenotipos de dispersión.

### 4.3 Microscopía confocal de células *in vivo*

Para estos experimentos las células se han plantado en cubres de 25mm de diámetro y se han observado en el microscopio confocal espectral Leica TCS-SP5 mediante la cámara celular Attofluor (Invitrogen), a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. En todos los casos se ha usado el objetivo de 63x de inmersión en aceite con una apertura numérica de 1,4, intentado obtener una resolución de alrededor de 50-60nm/pixel.

Mediante esta técnica se han analizado células COS-1 transfectadas con ADN (ADRP-GFP y HPos-OFPP), realizándose un seguimiento de estas proteínas por video-microscopía al añadir ácido oleico en el medio. En estos experimentos se tomaron imágenes cada 30" durante 15'. También se ha usado para realizar un seguimiento a tiempos largos de la localización comparada de HPos-OFPP y HNeu-GFP, tomando imágenes cada 30' durante 6h. La transfección fue realizada en placas de 9cm<sup>2</sup> y a las 24h fue realizado el experimento.

También se ha usado esta técnica para analizar la distribución de diferentes orgánulos evitando artefactos debidos a la fijación. Las tinciones realizadas se resumen en la siguiente tabla.

Tinción	Diana	Concentración final	Casa comercial	Excitación	Emisión
Nile red	CLs	0,83 µg/ml	Invitrogen	515	585
Hoechst-33258	Núcleos	3 µg/ml	Invitrogen	350	461
Mitotracker-Deep red	Mitocondrias	0,3µM	Invitrogen	644	665
Mitotracker-Green FM	Mitocondrias	0,1µM	Invitrogen	490	516
TMRM	Mitocondrias	100nM	Invitrogen	550	575

## 4.4 Videomicroscopía de contraste de fases

En estos experimentos se plantaron 10000 células Vero por pocillo de una cámara de 8 pocillos (IBIDI). Una vez adheridas las células se trataron con ácido oleico 175µg/ml durante 24h.

Al cabo de 24h se miran las células in vivo en el microscopio de epifluorescencia (Leica DMI6000 B) con el objetivo de 63x con una apertura óptica de 1.4, a 37°C y se seleccionan diversas posiciones para cada pocillo en el microscopio. Posteriormente se cambia el medio de los pocillos (con puntas estériles) sin mover la placa (400µl/pocillo). Los medios deben llevar Hepes 50mM (dado que no hay incubador de CO<sub>2</sub>).

Es conveniente rellenar 2 pocillos de los extremos de la placa con agua para evitar la evaporación del resto.

Finalmente se graban vídeos durante las horas indicadas en contraste de fases diferencial (DIC) tomando una imagen por minuto.

## 4.5 Análisis de las puntas de los microtúbulos

En estos ensayos se transfectaron las células con GFP-CLIP170 con *effectene*. Una vez transfectadas, se trataron con ácido oleico 175µg/ml durante 24h y posteriormente 16h en un medio sin glucosa. En el momento del experimento añadir Hepes a 25mM de concentración final.

Seguidamente se analizaron las células por videomicroscopía en el microscopio de epifluorescencia a 37°C y se seleccionan células con una expresión muy reducida de CLIP-170, dado que una excesiva expresión de esta proteína altera la morfología de los microtúbulos. Estas células fueron grabadas durante 1,5 minutos, tomando una imagen cada segundo.

Finalmente, mediante el programa ImageJ se cuantificó la cantidad de puntas de microtúbulos y la longitud de éstas.

## 4.6 Inmunocitoquímica

Esta técnica se usa para el análisis por microscopía de la localización intracelular de determinadas proteínas mediante anticuerpos específicos contra éstas.

Los controles necesarios consisten en no incubar un cubre con anticuerpo primario, pero sí con secundario, de manera que la fluorescencia observada corresponderá a la unión inespecífica del anticuerpo secundario, pudiendo ser esta restada de la de las otras muestras.

### PROTOCOLO:

A) Fijación: En esta tesis se han fijado las células con paraformaldehído o con metanol.

En el caso de anticuerpos como anti-myc o anti-ACSL3 se ha fijado las células con paraformaldehído y permeabilizado:

- Realizar 3 lavados rápidos de PBS en cada cubre.
- Incubar el cubre en paraformaldehído preparado al 4% en PBS, a temperatura ambiente. En caso que se realice una tinción de CLs incubar durante un mínimo de 1h, si tan solo se quiere detectar proteínas con 15-30' es suficiente.
- Realizar 3 lavados rápidos con PBS en cada cubre.
- Permeabilizar la membrana celular con tritón X-100 al 0,1% en PBS durante 10'. Alternativamente puede usarse saponina 0,1% en PBS.

En el caso de los anticuerpos anti-tubulina se ha permeabilizado con metanol, debido a que esta fijación elimina las proteínas solubles en el citoplasma quedando una tinción de microtúbulos más definida:

- Realizar 3 lavados rápidos de PBS en cada cubre.
- Incubar durante 2' con metanol a -20°C
- Realizar inmediatamente 3 lavados rápidos de PBS en cada cubre.

B) Bloqueo:

- Incubación con BSA 0,2% en PBS.

C) Incubación con el anticuerpo primario:

- Incubación del anticuerpo primario en solución de bloqueo durante 1h:

ACSL3 (Abnova H00002181-B01P) 1:200

myc (9E10 Abcam ab32) 1:500

En el caso de ACSL3, la permeabilización con saponina genera un marcaje muy exclusivo de CLs, y el tritón genera un marcaje de CLs y RE, aunque la estructura de los CLs se conserva mejor.

Tubulina-  $\alpha$  (DM1A Sigma T9026) 1:250

Detyrosinated tubulin (Millipore Ab3201) 1:100

- Realizar 3 lavados rápidos de PBS en cada cubre.

D) Incubación con el anticuerpo secundario:

- Incubación del anticuerpo secundario en solución de bloqueo durante 45' a una dilución 1:250. El anticuerpo secundario escogido depende de la especie en que se ha generado el primario y de la combinación de fluoróforos del experimento.

- Realizar 3 lavados rápidos de PBS en cada cubre.

- (opcional) En algunos casos se ha procedido a la tinción de los núcleos con DAPI en este punto. Realizando posteriormente 3 lavados adicionales con PBS.

E) Montaje de los cubres:

- Montar los cubres en la solución de mowiol.

En algunos casos en el medio de montaje se ha realizado la tinción de Nile red como se ha especificado anteriormente.

## **5. Aislamiento de orgánulos**

### **5.1 Purificación de mitocondrias**

Las cuantificaciones de colesterol y la respirometría de mitocondrias purificadas fueron realizadas por el grupo del Dr. Fernández-Checa. La purificación de mitocondrias de hígado de ratón en algunos casos fue realizada en nuestro laboratorio mediante gradiente de Percoll como en [587] (Anexo).

(Protocolo detallado en la versión en CD).

## 5.2 Fraccionamiento celular por gradientes de densidad

En estos experimentos se separan los diferentes orgánulos según su flotabilidad en un gradiente de sucrosa, quedando los CLs en la parte superior del gradiente debido a su baja densidad.

En los resultados presentados, el fraccionamiento celular se realiza en células COS-1 transfectadas con los péptidos HPos o HNeu. También ha sido usado para comprobar la acumulación de lípidos marcados fluorescentemente en diferentes tipos celulares, explicada más adelante.

En estos experimentos partimos de 4 placas de 60cm<sup>2</sup> a una confluencia del 80% en el día del experimento, por cada condición.

Las células se recogen con scraper a 4°C en **tampón de lisis** (50mM Tris-HCl, pH: 7.5, 150mM NaCl, 5mM EDTA + inhibidores de proteasas y fosfatasa) y se lisan por cavitación a 55bar durante 15' a 4°C, pasándolas posteriormente 25 veces por una aguja de 22G.

Seguidamente se centrifuga el lisado para eliminar los núcleos, se mezcla 1:1 con sucrosa 2,5M y se carga en la parte inferior de un gradiente de sucrosa con 6 fracciones del 5 al 30% de sucrosa. El gradiente se centrifuga a 214000G durante 3h.

Finalmente se recogen las fracciones del gradiente con un *centritube slicer* (Beckman Coulter) y se analiza la distribución de proteínas por *western blot* o la fluorescencia en un lector de placas (en el caso de los gradientes de células cargadas con AGs fluorescentes).

(Protocolo detallado en la versión en CD).

## 6. Bioquímica

### 6.1 Cuantificación de proteína por el método de Bradford

La cuantificación de la cantidad de proteína de las muestras se ha realizado siguiendo el método de Bradford [717] usando el reactivo BioRad Protein Assay (BioRad 500-0006).

Se ha analizado la absorbancia a 595nm y 450nm de las muestras, calculandose la ratio  $Abs_{595nm} / Abs_{450nm}$  de cada pocillo para obtener una recta patrón lineal [718], a partir de la cual se calculan los  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de proteína de cada muestra.

(Protocolo detallado en la versión en CD)

## 6.2 Análisis de la expresión de proteínas por *western blot*

Para el análisis de la expresión proteica en diferentes condiciones se usó la técnica de electroforesis de las muestras en un gel de acrilamida, seguida de la transferencia a una membrana (*western blot*) y posteriormente la inmunodetección de la proteína deseada en esta membrana mediante anticuerpos específicos.

Las células se lisaron en **tampón de lisis** (50mM Tris-HCl pH:7.5; 150mM NaCl; 5mM EDTA; 0,1% Tritón X-100 con inhibidores de proteasas y fosfatasa) mediante sonicación. Seguidamente se preparan la misma cantidad de proteína de cada muestra (entre 10-40µg) en **tampón de muestras** (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 30mM pH:7,0; Glicerol 30%; SDS 7,5%; DTT 4,5%; Azul de bromofenol 0,05%).

La separación de las proteínas según su peso molecular se realiza mediante electroforesis de las muestras en un gel de acrilamida usando el sistema de BioRad (Mini-Protean III electrophoresis cell) en **tampón de electroforesis** (SDS 1g/l; Tris-HCl 3,03g/l y Glicina 14,41 g/l), fijando el amperaje a 35mA hasta que el frente empieza a salir del gel. Posteriormente las proteínas se transfieren a una membrana con el sistema de BioRad (MiniTransBlot electrophoretic transfer cell, BioRad), usando una membrana de 0,45µm de poro, en algunos casos de **nitrocelulosa** (BioRad #162-0115) y en otros de **PVDF** (Millipore IPVH00010). La transferencia se realiza de forma estándar a 4°C en **tampón de transferencia** (SDS 0,25g/l; Tris-HCl 3,77g/l; Glicina 18 g/l; 20%v/v Icohol), fijando el voltaje a 60V y durante 1h y 30min.

El análisis de la cantidad de determinadas proteínas en la membrana se realiza mediante la incubación con anticuerpos específicos para esas proteínas (resumidos en la siguiente tabla).

Proteína	Referencia Anticuerpo	Casa comercial	Peso molecular	Dilución usada	Especie	Observaciones
Actina	ab3280	Abcam	42kDa	1:1000	mo	
P-ACC (Ser79)	#3661	Cell signaling	280kDa	1:1000	Rb	Transferencia 2x
ACSL3	H00002181-B01P	Abnova			mo	
ADRP	ab52355	Abcam	48kDa	1:1000	rb	
AMPKα (23A3)	#2603	Cell signaling	62kDa	1:1000	rb	
P-AMPK (Thr172) (40H9)	#2535	Cell signaling	62kDa	1:1000	rb	
Caveolina	610060	BD Biosciences	21 kDa	1:5000	rb	1h Temp. Amb.
Citocromo C	556433	BD Pharmigen	15 kDa	1:500	mo	2h Temp. Amb.
GFP	ab290	Abcam	-	1:1000	rb	
GM-130	610822	BD Transduction	130 kDa	1:1000	mo	
Rab11	610656	BD Transduction	24 kDa	1:1000	mo	
Sec61α	#07-204	Upstate	40kDa	1:2500	rb	2h Temp. Amb.
Tubulina-α(DM1A)	T9026	Sigma	55 kDa	1:1000	mo	
Tubulina-α acetilada (6-11B-1)	ab24610	Abcam	55kDa	1:1000	mo	
Tubulina detirosinada	AB3201	Millipore	50kDa	1:500	rb	

La detección de los anticuerpos se ha realizado mediante el uso de anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa (HRP), analizados con el kit quimioluminiscente de detección de peroxidasa EZ-ECL (Biological industries 20-500-120), mediante la exposición de las membranas a films fotográficos (Fuji



Medical X-ray film 47410) y su posterior revelado.

La cuantificación de la intensidad de las bandas de films procedentes de *western blot* se realizó con el programa ImageJ (National Institutes of Health).

(Protocolo detallado en la versión en CD)

## 6.3 Cromatografía en capa fina

Esta técnica consiste en la extracción de lípidos de una muestra para la posterior separación de las diferentes especies lipídicas según su hidrofobicidad. En esta técnica las diferentes especies lipídicas son arrastradas a lo largo de una placa de sílice por capilaridad gracias a su solubilidad a un disolvente orgánico (Fase móvil). Debido a la diferente solubilidad de los lípidos según el disolvente orgánico, el uso de fases móviles con diferente composición permite la separación de diferentes especies lipídicas.

En nuestro caso realizamos una cromatografía en capa fina con dos fases móviles, que nos permite en primera instancia separar los lípidos polares (fosfolípidos esencialmente) y en segunda instancia separar los lípidos neutros de manera que se obtiene un patrón de bandas que corresponden tanto a lípidos polares como apolares permitiéndonos, en una misma cromatografía, cuantificar fosfolípidos y triglicéridos. De otro modo, con sólo una fase móvil una de las dos especies quedaría en el punto inicial del carril y no la podríamos separar de otros lípidos de similar hidrofobicidad.

El protocolo, brevemente, consiste en la extracción lipídica de las muestras mediante el método de Bligh y Dyer para seguidamente cargar los lípidos de cada muestra en una placa con carriles de sílice. Dicha placa se incuba con la **Fase móvil 1** (Cloroformo:Metanol:Agua, 65:30:5) hasta que sube por capilaridad a 1/3 del recorrido del carril y posteriormente con la **Fase móvil 2** (Hexano:Diétil éter:Ácido acético, 70:30:1) hasta que sube por capilaridad a 0,5cm del final del recorrido del carril.

En los experimentos con radioactividad se ha expuesto un film a la placa durante unos días y seguidamente se ha revelado el film. Según la intensidad de las bandas, se han realizado sucesivas exposiciones a tiempos mayores o menores. Las bandas han sido cuantificadas por densitometría como se explica en el apartado de *western blot*.

En los experimentos con fluorescencia la fluorescencia de la placa se ha leído en un lector ImageQuant LAS400 (GE Healthcare) con un filtro de excitación de 460nm y el filtro de emisión Y515Di (dado que el lípido fluorescente usado es el BODIPY-FLC16, con una emisión de color verde).

(Protocolo detallado en la versión en CD)

## 6.4 Ensayo de actividad ACSL

Este ensayo (realizado como se describe en [719]) permite la cuantificación de la actividad ACSL total en un lisado celular, incubando el lisado con ácido oleico radioactivo y analizando la producción *in vitro* de su forma unida a coenzima A.

En los ensayos con células transfectadas con siRNA, se han transfectado 3 pocillos de 9cm<sup>2</sup> (día anterior 100000) y al día siguiente replantado en una placa de 60cm<sup>2</sup>. El ensayo se ha realizado a las 72h de transfección.

En los ensayos con células transfectadas con ADN se plantó una placa de 60cm<sup>2</sup> por condición que fue transfectada con lipofectamina al día siguiente. El ensayo de actividad ACSL se realizó a las 24h de la transfección. En este caso, se comparó mediante citometría de flujo la expresión de GFP de los diferentes péptidos para corregir la cantidad de proteína con que se realiza el ensayo por la expresión diferencial de los plásmidos.

(Protocolo detallado en la versión en CD)

## 6.5 Análisis de la secreción de lactato al medio y del contenido de TAG

En estos experimentos se planta una placa de 60cm<sup>2</sup> de células COS-1 o Vero por condición (900000 células/placa). Una vez enganchadas, las células son tratadas con ácido oleico 175µg/ml durante 24h y posteriormente durante 16h con los tratamientos indicados (minimizar el medio por placa a 6ml).

Al cabo del tratamiento se recogen 200µl de medio para medir la concentración de lactato y se recogen las células por tripsinización en 220 µl de **tampón de lisis** (50mM Tris-HCl, pH: 7.5, 150mM NaCl, 5mM EDTA + inhibidores de proteasas y fosfatasa). Las muestras se sonicán y se cuantifica la proteína. Posteriormente se cuantifica la concentración de TAG en los lisados y la concentración de lactato en el medio recogido en el laboratorio de análisis clínicos del *Hospital Clínic i Provincial de Barcelona*, usando kits enzimáticos colorimétricos comerciales de la marca Bayer. La concentración de ambos metabolitos fue corregida por la cantidad de proteína.

(Protocolo detallado en la versión en CD)

## 7. Ensayos de metabolismo

### 7.1 Respirometría de alta resolución

Este método consiste en el análisis de la concentración de oxígeno en el medio en el que están las células, y cómo esta se modifica al añadir determinadas drogas que afectan a la cadena respiratoria. Los experimentos de respirometría de células intactas del primer apartado de resultados los realicé en el laboratorio del Dr. Antonio Zorzano. La respirometría mostrada en el último apartado de resultados fue realizada por la Dra. Marta Bosch en nuestro laboratorio. En ambos casos se usó un respirómetro de alta resolución Oxygraph-2K (Oroboros instruments).

Aunque en esta tesis hemos aplicado este método al análisis de la respiración en células intactas (los experimentos realizados en mitocondrias aisladas fueron realizados por el grupo del Dr. Fernández-Checa usando otro sistema de respirometría), también se puede analizar la respiración en muestras de tejido, mitocondrias aisladas o células permeabilizadas. En los dos últimos casos es necesaria la adición de determinados sustratos como ADP o succinato.

Hay diversos protocolos de respirometría, que permiten analizar diferentes parámetros de la cadena respiratoria. El protocolo usado en esta tesis consiste en la adición seriada de oligomicina, FCCP y antimicina A.

Inicialmente se analiza el consumo de oxígeno de las células en suspensión en la cámara del respirómetro con el medio en que se han resuspendido, a este consumo de oxígeno se le llama **respiración de rutina (R)**.

Posteriormente se añade **oligomicina** (inhibidor de la ATP-sintasa) para que la concentración final sea 0,5µg/ml. Su adición disminuye la salida de protones del espacio intermembrana aumentando el potencial de membrana y reduciendo el flujo de electrones en la cadena respiratoria y como consecuencia el consumo de oxígeno. La disminución de la respiración al añadir esta droga corresponde al **porcentaje del consumo de oxígeno destinado a la síntesis de ATP**. Una vez añadida la droga, al estabilizarse la lectura, se determina el consumo de oxígeno restante, que está dedicado a compensar la pérdida de protones del espacio intermembrana independiente de la síntesis de ATP por lo tanto corresponde a la **respiración no asociada a la producción de ATP (L, proton leak)**.

Seguidamente se añaden sucesivas dosis de 4µl de **FCCP** 0,1mM, dejando estabilizar la lectura después cada dosis, el consumo de oxígeno aumenta después de cada dosis hasta llegar a un punto en que disminuye. El FCCP es un agente desacoplador que permeabiliza la membrana interna mitocondrial promoviendo el paso de protones a la matriz mitocondrial y por lo tanto la pérdida de potencial de membrana. Para compensar la enorme pérdida de protones, al añadir FCCP, la cadena respiratoria funciona al máximo de su capacidad, consumiendo el máximo de oxígeno. En el respirómetro se selecciona el **máximo consumo de oxígeno (E)** que corresponde a la **capacidad máxima de la cadena respiratoria mitocondrial**. En células intactas, sin la adición de concentraciones saturantes de determinados sustratos, esta capacidad máxima depende de la disponibilidad de sustratos, la presencia de oxígeno en cantidad suficiente y de la capacidad de la célula de producir NADH o

FADH<sub>2</sub> esencialmente en el ciclo de Krebs. Así, células con un ciclo de Krebs reducido tendrán una capacidad máxima menor. La dosis de FCCP a la que se obtiene la máxima respiración varía según las células y condición metabólica, siendo mayor en situaciones de mayor potencial de membrana.

Una vez la dosis de FCCP reduce el consumo de oxígeno se procede a añadir 1 µl de Antimicina 5mM. Esta droga inhibe el complejo III de la cadena respiratoria, cortando el flujo de electrones hacia el oxígeno. La adición de esta droga inhibe completamente la cadena respiratoria eliminando el consumo de oxígeno dependiente de ésta. El consumo de oxígeno restante se considera **consumo de oxígeno extramitocondrial (ROX)** y debe ser restado del resto.

En muchos casos, los resultados de la respirometría se expresan en forma de tasas, analizando los diferentes consumos en relación a la capacidad máxima:

**R/E:** Respiración de rutina (R) (previa a la adición de ninguna droga) dividida por la capacidad máxima de la cadena respiratoria (E). Expresa la proporción de la capacidad máxima de respiración que las células usan de rutina, dando una idea del margen de incremento de respiración que tienen.

**L/E:** Respiración en presencia de oligomicina (L) (no acoplada a la síntesis de ATP) dividida por la capacidad máxima (E). Da una idea de la cantidad de pérdida de protones del espacio intermembrana, siendo una medida del proton leak. Una mayor L/E es indicativa de un mayor desacoplamiento de la cadena respiratoria con la fosforilación oxidativa.

**netR/E:** (R/E)-(L/E). Esta tasa nos da una idea de la proporción del consumo máximo de oxígeno (E) que es destinado a la síntesis de ATP en estas condiciones. Da una idea del flujo de la ATPsintasa en estas células en las condiciones en que son cultivadas.

**ROX/E:** Respiración en presencia de antimicina A (ROX) dividida por la capacidad máxima (E). Expresa la proporción de consumo de oxígeno dedicado a la respiración extramitocondrial.

(Protocolo detallado en la versión en CD)

## 7.2 Ensayo de oxidación de glucosa

En este ensayo se incuban células con glucosa marcada radioactivamente y se analiza la radioactividad asociada al CO<sub>2</sub> obtenido al final de la incubación, que representará la capacidad de oxidación de la glucosa en esa condición.

Las células se incuban durante 3h a 37°C en 450 µl de **KRBH** (KRBx5 1:5; NaHCO<sub>3</sub> 2mM; Hepes pH:7,4 10mM en H<sub>2</sub>O) + 50 µl de Glucosa-<sup>14</sup>C 250mM preparada en KRBH. Los pocillos de la placa se sellan con *parafilm* y se prepara una cámara estanca de *parafilm* encima de cada pocillo abierta a este por un agujero. Dentro de cada cámara se pone un papel *whatmann* de 2x2cm mojado con 150 µl de KOH 1M. El CO<sub>2</sub> quedará retenido en el papel *whatmann* mojado con KOH, debido a que en un entorno acuoso básico como la solución de KOH se disuelve formando bicarbonato que queda en el papel.

El KRBH se prepara a partir de **KRBx5** (NaCl 9,86g/l; 0.335g/l KCl; 0.085g/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0.125g/l MgSO<sub>4</sub>;

0.275g/l  $\text{CaCl}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$ ), que se puede guardar unos días a 4°C.

Al acabar la incubación se inyectan 50µl de  $\text{HClO}_4$  40% con una jeringuilla a cada pocillo y se incuba un mínimo de 1h (en células oxidativas) o O/N (en células con poca capacidad de oxidación) a 37°C.

Finalmente se lee la radioactividad asociada a cada papel *whatmann*, sumergiéndolo en líquido de centelleo, en un lector de radioactividad.

En un vial aparte se mide la radioactividad de un volumen conocido de medio con glucosa- $^{14}\text{C}$  para determinar a cuantas cpm corresponde una cantidad conocida de glucosa.

(Protocolo detallado en la versión en CD)

### 7.3 Ensayo de $\beta$ -oxidación de AGs del medio

Mediante este ensayo se analiza la capacidad de las células de  $\beta$ -oxidar ácido oleico presente en el medio. La  $\beta$ -oxidación se mide mediante el análisis del  $\text{CO}_2$  producido, del mismo modo que en el ensayo de oxidación de glucosa, y también mediante la cuantificación de la radioactividad en forma de intermediarios solubles en agua, llamados productos solubles en ácido (ASP). Estos intermediarios corresponden mayoritariamente a cuerpos cetónicos, intermediarios del ciclo de Krebs, acilcarnitina, acetil-CoA o acil-CoA, y se pueden separar del ácido oleico radioactivo presente en el medio debido a la precipitación de éste en el entorno ácido creado al inyectar ácido perclórico.

Las células fueron plantadas en placas de 9cm<sup>2</sup> de modo que al final del experimento estuvieran confluentes. En el caso de Vero y C2C12 se plantaron 100000 y 85000 células respectivamente. A las 48h de plantar las células se realizó el experimento.

Las células se incuban con 1ml de mix de ácido oleico radioactivo (Para cada pocillo: 50µl de ácido oleico- $^{14}\text{C}$  (706,2µg/ml) + ácido oleico no marcado + medio, de manera que la concentración final de ácido oleico sea 175µg/ml) a 37°C durante 6h con un montaje de *parafilm* y papel *whatmann* como el del ensayo de oxidación de glucosa. Al cabo del tratamiento se inyectan 100µl de ácido perclórico 40% y se incuba la placa O/N a 37°C.

Finalmente se lee la radioactividad asociada a cada papel *whatmann*, sumergiéndolo en líquido de centelleo, en un lector de radioactividad, obteniéndose la producción de  $\text{CO}_2$  a partir del oleico marcado. Aparte, se recoge parte del volumen del medio y se centrifuga para eliminar el oleico precipitado. Parte del sobrenadante se mezcla con líquido de centelleo y se lee en un contador de radioactividad, obteniéndose la cantidad de ASP producidos a partir del oleico marcado.

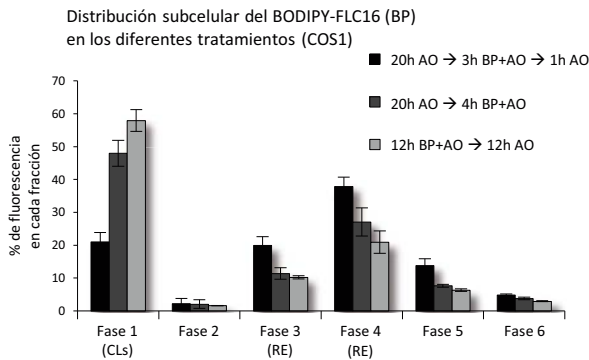
Siempre se mide la radioactividad de un volumen conocido del medio en que se han tratado las células, para conocer a qué cantidad de ácido oleico oxidado corresponden las cpm obtenidas.

(Protocolo detallado en la versión en CD)

## 7.4 Acumulación de AGs marcados en los CLs

Para poder analizar el destino metabólico de los AGs contenidos en los CLs, es necesario acumular AGs marcados en los CLs. Para ello, en esta tesis, optimizamos los tratamientos con AGs marcados hasta tener la mayor parte de AGs en los CLs. Se realizaron diferentes tiempos de tratamiento como los indicados en el gráfico y se realizó un fraccionamiento celular como se ha indicado anteriormente. Posteriormente, se analizó la cantidad de fluorescencia debida al BODIPY-FLC16 presente en cada fase del fraccionamiento celular mediante un lector de placas.

El protocolo de tratamiento que mayor rendimiento obtuvo fue el tratamiento de 12h con ácido oleico y BODIPY-FLC16 1 $\mu$ M, y posteriormente otras 12h con ácido oleico (Figura 3). Este tratamiento dio un buen rendimiento en diferentes líneas celulares como AML12, COS-1 y Vero .



**Figura 3. Comparativa de diferentes protocolos de acumulación de AGs marcados en CLs en células COS-1.**

Este protocolo de acumulación de AGs marcados en CLs se ha usado para analizar el direccionamiento de los AGs contenidos en éstos a la síntesis de fosfolípidos (explicado anteriormente) o a la  $\beta$ -oxidación (explicado posteriormente).

## 7.5 Ensayo de $\beta$ -oxidación de los AGs procedentes de CLs

En este ensayo se acumula ácido oleico radioactivo en los CLs de las células (como se ha explicado anteriormente) y se analiza la posterior producción de  $\text{CO}_2$  y ASP marcados en los tratamientos correspondientes.

En estos experimentos se plantan las células para que al cabo de dos días estén a 80-90%. COS-1: 200000 células. Vero: 150000 células. Una vez adheridas a la placa se incuban 12h a 37°C con una combinación de ácido oleico frío con ácido oleico radioactivo. La proporción usada depende de la cantidad oxidación de las células. En células COS-1 se usa la misma proporción que en el ensayo de oxidación de AGs del medio, y en Vero el doble de ácido oleico- $^{14}\text{C}$  con la misma concentración total

de ácido oleico.

Posteriormente se incuban las células 12h a 37°C con ácido oleico frío. Al acabar la carga de CLs se incuban las células a 37°C durante 16h en los tratamientos indicados tapando la placa con el montaje de *parafilm* con papeles *whatmann* para recoger el CO<sub>2</sub> como en el ensayo de oxidación de glucosa. Al acabar los tratamientos se inyecta ácido perclórico 40% y se incuban 24h adicionales a 37°C.

Finalmente se lee la radioactividad asociada a cada papel *whatmann*, sumergiéndolo en líquido de centelleo, en un lector de radioactividad, obteniéndose la producción de CO<sub>2</sub> a partir del oleico marcado. Aparte, se recoge parte del volumen del medio y se centrifuga para eliminar el oleico precipitado. Parte del sobrenadante se mezcla con líquido de centelleo y se lee en un contador de radioactividad, obteniéndose la cantidad de ASP producidos a partir del oleico marcado.

Siempre se mide la radioactividad de un volumen conocido del medio en que se han tratado las células, para conocer a qué cantidad de ácido oleico oxidado corresponden las cpm obtenidas.

(Protocolo detallado en la versión en CD)

## 7.6 Ensayo de paso de AGs entre células

En este ensayo se analiza el paso de AGs de una población con CLs a una población sin CLs, comparándolo con el paso a otra población con CLs. Para ello se realiza un experimento similar al de tinción de células con DDAO-SE explicado anteriormente.

En este caso se compara la fluorescencia verde de células no tratadas con ácido oleico y marcadas con DDAO-SE como se ha explicado anteriormente que han sido mezcladas o bien con otras células no tratadas, o bien con células en que se ha acumulado AG BODIPY-FLC16 en los CLs (del modo en que se indica en el apartado correspondiente).

En estos experimentos también se compara la pérdida de fluorescencia verde en células cargadas con BODIPY-FLC16 que han sido mezcladas con células cargadas del mismo modo o bien con células no cargadas.

Por lo tanto se han tratado placas para acumular AG fluorescente en los CLs y otras no cargadas. Posteriormente se han mezclado y teñido con DDAO-SE como se ha comentado anteriormente y vuelto a plantar. Seguidamente, las células han sido incubadas en medio control durante 24h.

Al cabo de este tiempo las células han sido tripsinizadas y analizadas por citometría como en el ensayo de captación de AGs, detectando con el láser 633nm y filtro 660/20 las células teñidas con DDAO-SE.

## 8. Citometría de flujo

En todos los ensayos mediante esta técnica se ha usado el citómetro BD FACS Canto II (BD Bioscience) con láseres 405nm, 488nm y 633nm, excepto en los ensayos de *cell sorting*.

Independientemente de la tinción, inicialmente se seleccionan las células individuales separándolas del *debris* celular y de los agregados de células, usando los parámetros de tamaño (*Forward scatter*, FSC) y complejidad o refringencia intracelular (*Side scatter*, SSC). Para ello se representa un diagrama de puntos de FSC-A y SSC-A, en el que se selecciona la población correspondiente a las células separándola del *debris* celular (de tamaño mucho menor). Seguidamente, se representan FSC-A y FSC-H, estos parámetros deben ser proporcionales si se trata de una sola célula, mientras que no lo serán si la partícula analizada es un agregado de células (con un mismo valor de FSC-H pero un valor de FSC-A mayor). Así, se seleccionan las partículas que se encuentran en la diagonal, que corresponderán a células individuales. La fluorescencia de la tinción correspondiente se analiza tan sólo en estas células individuales.

### 8.1 Análisis del perfil de ciclo

Mediante esta técnica se obtiene un perfil de ciclo celular, donde se observa un primer pico correspondiente a las células con el ADN sin duplicar (Fase G1 del ciclo celular) y un segundo pico de células con el ADN duplicado (Fases G2/M del ciclo celular). Las células con contenido de ADN intermedio entre ambos picos corresponden a las células en Fase S del ciclo celular.

En este ensayo se recogen las células por tripsinización y se fijan con etanol 70% a 4°C O/N o 3' a -20°C. Una vez fijadas las células se incuban en 500µl de **solución de yoduro de propidio** (0,1% TritónX100; 0,2mg/ml RNAasa DNAasa free; 0,02mg/ml yoduro de propidio; en PBS) durante 15' a temperatura ambiente evitando la exposición a la luz.

La fluorescencia del yoduro de propidio se detecta con el láser 488nm y filtro 585/42. La fluorescencia del yoduro de propidio se muestra en un histograma lineal y se ajusta el voltaje para detectar claramente el pico de células en fase G1 y el pico de células en fase G2 (con el doble de contenido de ADN).

(Protocolo detallado en la versión en CD)

### 8.2 Análisis de la apoptosis

Este ensayo permite analizar el porcentaje de células apoptóticas y necróticas. Durante el inicio de la apoptosis, las células pierden la asimetría entre las monocapas externa e interna de la membrana plasmática, aumentando la cantidad de fosfatidilserina expuesta al medio. La AnnexinaV tiene alta afinidad por este fosfolípido, así, la incubación con esta proteína en células no permeabilizadas permite



detectar qué células han iniciado la apoptosis.

Por otro lado, el yoduro de propidio es un agente que emite fluorescencia cuando se intercala en el ADN. La célula no es permeable a esta molécula, de manera que la incubación con ésta permite detectar las células necróticas con menor integridad de membrana plasmática, o aquellas células en estadios avanzados de apoptosis.

En estos experimentos se parte de una placa de 9cm<sup>2</sup> para cada réplica de cada condición. En los experimentos realizados se plantaron 100000 células MEF o 3T3L1 y al día siguiente se analizó la apoptosis.

Para este ensayo se recogen las células que quedan en suspensión en el medio y mediante tripsinización las que quedan adheridas a la placa.

Para la tinción con annexinaV y yoduro de propidio se incuban las células 15' a temperatura ambiente protegidos de la luz en 500µl de **tampón de annexinas** (10mM Hepes (pH 7.4); 140mM NaCl; 2,5mM CaCl<sub>2</sub>) con las tinciones: **Ioduro de Propidio** 1:10000 a partir del stock 1mg/ml (Sigma P4864); **AnnexinV-APC** 1:250 (BD Pharmigen 550474).

Finalmente se analiza la fluorescencia del yoduro de propidio (laser 488nm y filtro 585/42) y de la annexinaV-APC (laser 633nm y filtro 660/20) en el citómetro. En la doble tinción, las células tan solo positivas por yoduro de propidio serán consideradas necróticas, las células tan solo positivas por AnnexinaV estarán en un estadio inicial de la apoptosis y las células con la doble tinción corresponderán a estadios avanzados de apoptosis.

(Protocolo detallado en la versión en CD)

## 8.3 Análisis del potencial de membrana

En estos experimentos se parte de una placa de 9cm<sup>2</sup> para cada replica de cada condición. En los experimentos realizados se plantaron 100000 células MEF o 3T3L1 y al día siguiente se analizó el potencial de membrana mediante la tinción con TMRM. El TMRM (Invitrogen T668) es un marcador fluorescente que emite de forma proporcional al potencial de membrana mitocondrial.

Para este ensayo se recogen las células mediante tripsinización y se incuban a oscuras a 37°C durante 5-10' en 500µl de PBS con TMRM 50-500nM. Hay que tener en cuenta que se debe ajustar la concentración para que la fluorescencia sea directamente proporcional al potencial de membrana, dado que a partir de una determinada concentración la fluorescencia es inversamente proporcional al potencial de membrana.

Finalmente se lee la fluorescencia en el citómetro excitando con el láser 488nm y recogiendo la fluorescencia con el filtro 585/42.

(Protocolo detallado en la versión en CD)

## 8.4 Análisis del estrés oxidativo

El estrés oxidativo se ha analizado mediante la tinción con **H<sub>2</sub>DCF-DA** (Invitrogen D-399). El H<sub>2</sub>DCF-DA es una molécula que entra en las células donde es modificada por esterasas intracelulares obteniéndose una molécula que al reaccionar con especies reactivas de oxígeno (especialmente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) emite fluorescencia.

La fluorescencia de las células puede medirse en un lector de placas con las células adheridas (corrigiendo el valor de fluorescencia posteriormente con una medida del número celular, mediante contaje, bradford o cristal violeta) o célula a célula mediante citometría. Seguidamente se explica el protocolo de medida por citometría, que ha sido el usado más frecuentemente en esta tesis.

El estrés oxidativo en algunos casos también se ha analizado mediante la tinción de **dihydroethidium** (DHE) (Invitrogen D-11347) más específica por los iones superóxido (subclase de radicales de oxígeno). Cabe tener en cuenta que en algunos casos ambas tinciones de ROS pueden dar resultados diferentes por su diferente especificidad.

Las células se incuban 30' a 37°C en 1ml de DMEM-fenol free sin suero (puede contener esterasas) con H<sub>2</sub>DCF-DA 15µM o DHE 10µM. Posteriormente se recogen por tripsinización neutralizando la tripsina en medio fenol-free y se resuspenden en PBS. La fluorescencia se lee en el citómetro usando para el H<sub>2</sub>DCF-DA el láser 488nm y el filtro 530/30, y para el DHE el láser 488nm y el filtro 585/42.

(Protocolo detallado en la versión en CD)

## 8.5 Análisis de la cantidad de CLs

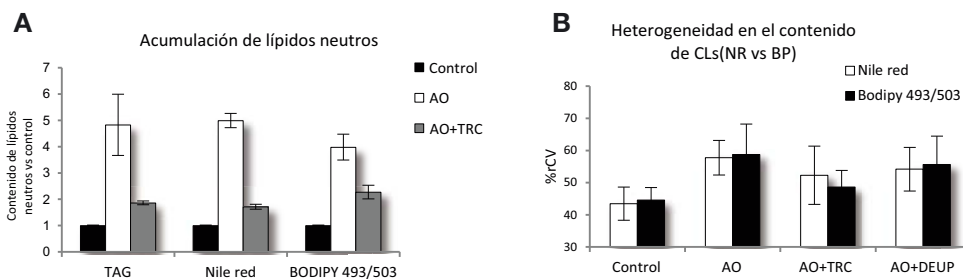
En esta tesis hemos usado el análisis de tinciones fluorescentes de CLs por citometría de flujo para cuantificar el contenido de CLs y la heterogeneidad poblacional en éste en diferentes condiciones. El análisis de CLs por citometría de flujo había sido usado en algunas publicaciones [228, 328, 616] aunque el uso de esta técnica no estaba muy extendido en el campo. Por ello optimizamos la tinción de Nile red (explicado anteriormente) para su análisis por citometría de flujo.

Se usó como stock de Nile red una dilución de éste en DMSO a una concentración conocida (2,5mg/ml) que se puede mantener a -20°C.

Inicialmente se probaron diferentes concentraciones de Nile red y número de células con el fin de obtener una concentración de Nile red, la fluorescencia de la cual no cambiara según el número de células. A concentraciones entre 0,1 y 1µg/ml la intensidad disminuía según aumentaba el número de células, mientras que a partir de 5µg/ml la fluorescencia era exactamente la misma, probablemente debido a que la cantidad de tinción está en exceso y su fluorescencia solo depende de la cantidad de lípidos, no de la cantidad de células en que se reparte la tinción. Este punto es importante, debido a que en este trabajo realizamos tratamientos con diferentes drogas y condiciones metabólicas que afectan a la proliferación celular y a la apoptosis, de manera que frecuentemente se comparan condi-

ciones con diferente número de células.

La cantidad de CLs analizada por este método reproduce la cuantificación bioquímica de los triglicéridos, así como la cantidad de CLs detectada mediante el análisis por citometría de flujo de la tinción de BODIPI 493/503, otro marcador de lípidos neutros (Figura 4A). Además, la heterogeneidad observada entre ambas tinciones de CLs es similar (Figura 4B).



**Figura 4. Comparativa de diferentes métodos de análisis del contenido celular de lípidos neutros.** (A) Análisis del contenido de CLs. (B) Análisis de la heterogeneidad en el contenido de CLs mediante diferentes métodos.

#### PROTOCOLO:

Para estos experimentos se plantaron las células de modo que el día del experimento estén a un 75-80% de confluencia.

- Recoger las células por tripsinización y centrifugarlas a 700G durante 4' a temperatura ambiente.
- Resuspender las muestras en PBS y centrifugarlas a 700G durante 4' a temperatura ambiente.
- Resuspender cada muestra en 500µl de PBS-Nile red 5µg/ml preparado inmediatamente antes (en el caso de la tinción con BODIPY 493/503 (Invitrogen D-3922), 0,1µg/ml en PBS).
- Incubar durante 15' a temperatura ambiente evitando la exposición a la luz.
- Leer en el citómetro usando el láser 488nm. Los filtros de emisión usados son: 585/42 para analizar los lípidos neutros teñidos con Nile red (CLs); 670/20 para analizar los lípidos polares teñidos con Nile red (PL) (no mostrados en esta tesis) y 530/30 para analizar los lípidos neutros en la tinción con BODIPY 493/503.

La fluorescencia de esta tinción es estable durante aproximadamente 1h, es recomendable leer todos los tubos en este período de tiempo. En algunos casos al cabo de los 15' la tinción no es completa, para evitar infravalorar la cantidad de CLs, releer los primeros tubos al cabo de un cierto tiempo y comprobar que se obtenga el mismo valor.

Como en la mayoría de tinciones *in vivo*, en caso de haber réplicas es recomendable primero leer una réplica de todas las condiciones y luego la segunda réplica.

*Análisis de la heterogeneidad:*

En el análisis del contenido de CLs por citometría, además de la fluorescencia promedio también se

ha analizado el **coeficiente robusto de variación** (%rCV) que permite valorar la heterogeneidad de la muestra para el parámetro estimado. Este parámetro ha sido calculado por el programa propio del citómetro (BD FACSDiva) según la fórmula:

$$\%rCV = rSD/mediana * 100, \text{ donde: } rSD = \text{mediana}(|x_i - \text{mediana}_x|) * 1,4826$$

Los estadísticos robustos permiten minimizar el impacto de un bajo número de valores que se escapan mucho de la mediana de la población.

Además del %rCV, en algunos casos se ha calculado el **coeficiente de asimetría**. Para dicho cálculo se ha exportado los datos de cada célula analizada en el citómetro al excel, donde se ha calculado el coeficiente de asimetría de la distribución de puntos, según la fórmula:

$$\text{Coeficiente de asimetría} = \frac{n}{(n-1) * (n-2)} * \sum \left( \frac{x_i - \bar{x}}{s} \right)^3$$

## 8.6 Análisis de la captación de AGs

La captación de AGs se ha cuantificado tratando las células con el ácido graso fluorescente BODIPY-FLC16 (Invitrogen D-3821) 1µM durante 20' en el medio de las células y analizando la cantidad incorporada por las células.

Para estos experimentos se plantaron las células de manera que el día del experimento esten a un 75% de confluencia, y al día siguiente fueron tratadas con ácido oleico 175µg/ml. El experimento se llevó a cabo a las 24h de carga de CLs.

Al acabar la incubación con BODIPY-FLC16, las células se recogen por tripsinización y se resuspenden en PBS. Finalmente la fluorescencia asociada al BODIPY-FLC16 se lee en el citómetro excitando con el láser 488nm y recogiendo la fluorescencia con el filtro 530/30.

En otros experimentos la captación de AGs se ha medido en poblaciones mixtas formadas por células muy cargadas de CLs y otras poco cargadas con CLs y previamente teñidas con DDAO-SE.

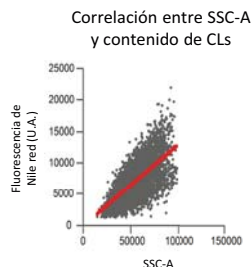
## 8.7 Separación de células con diferente contenido de CLs (cell sorting)

Debido a que los CLs son orgánulos muy refringentes, la acumulación de CLs incrementa el parámetro SSC-A que mide la complejidad celular. Así, el valor de este parámetro es proporcional al contenido de CLs y se ha usado para cuantificar estos orgánulos [720]. En este trabajo hemos comprobado esta proporcionalidad (Figura 5).

Cabe destacar que en cambio no existe correlación con el parámetro FSC-A, que mide el tamaño

celular (datos no mostrados).

Aprovechando esta característica, se separaron las células en un citómetro BD FACSAria SORP (BD Biosciences) usando el *nozzle* de 100, el láser de 488nm a 20mwatts y *area scaling* de 0,49.



**Figura 5. Correlación entre SSC-A y el contenido de CLs en células AML12.**

#### A) Preparación de las células:

Para estos ensayos se plantaron 6 placas de 150cm<sup>2</sup> con células AML12 para que estén confluentes el día del experimento. Al día siguiente se trataron con ácido oleico 175µg/ml. Al cabo de 24h se recogieron por tripsinización en tandas de 2 placas, neutralizando la tripsina con **tampón de sorting** filtrado (EDTA 1mM; Hepes 25mM pH: 7.0; FBS 1% en PBS). Posteriormente se contaron las células, se centrifugaron y se resuspendieron a una concentración de 6-7·10<sup>6</sup> células/ml en tampón de sorting. Finalmente, las células se filtraron en un filtro de 0,45 µm y se llevaron al citómetro.

#### B) Separación de las células según su contenido de CLs:

En el citómetro, las células se mantuvieron en agitación a 37°C en tampón de sorting. Inicialmente se seleccionaron las células vivas e individuales mediante FSC-A/SSC-A y FSC-A/FSC-H. Posteriormente, entre las células individuales, se seleccionó el 15% de cada extremo de la distribución de SSC-A, que representa el 15% de células con mayor y menor contenido de CLs, y se recogen en tubos diferentes a temperatura ambiente, en medio de cultivo. La separación se llevó a cabo a unos 3000 eventos/segundo.

#### C) Análisis posteriores:

Una vez separadas las células se han realizado diferentes experimentos:

- Análisis por citometría del **contenido de CLs** (para comprobar la separación por cantidad de CLs), el **estrés oxidativo** y la **captación de AGs**. En estos experimentos se dividen las células en tubos con 100000 células por tubo, se centrifugan y se resuspenden en las diferentes tinciones de DCF (estrés oxidativo) y Nile red (CLs) en PBS a las concentraciones indicadas en cada caso. En los experimentos de captación de AGs, se resuspenden en PBS con BODIPY-FLC16 1µM y se incuban 10' a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugan y resuspenden en PBS. La lectura en cada caso se lleva a cabo como se explica en los protocolos individuales

- Plantar las células de alto y bajo contenido de CLs, obtenidas mediante *cell sorting*, en placas separadas (250000 células/placa 9cm<sup>2</sup>) y cultivarlas durante una semana para descargarse de CLs. Posteriormente se trataron 24h en medio control o con ácido oleico 175µg/ml y se analizó el contenido de CLs como se ha explicado en el protocolo de análisis del contenido de CLs por citometría. En estos experimentos se plantaron las células en tandas, cada vez que se obtenía 1·10<sup>6</sup> células separadas con alto o bajo contenido en CLs, esas células eran plantadas (para evitar la muerte celular por estar demasiado tiempo en suspensión).

## 8.8 Análisis de la fluidez de la membrana mitocondrial

En esta técnica, optimizada por la Dra. Marta Bosch, se aíslan mitocondrias de hígado de ratón y se tiñen con la sonda fluorescente di-4-ANEPPDHQ (Invitrogen D-36802) que cambia de emisión según si se encuentra en una membrana más condensada o más fluida [721]. Excitada con el láser de 488nm, esta sonda emite fluorescencia a 540-580nm al encontrarse en dominios ordenados (condensados) y a 620-700nm al encontrarse en dominios desordenados (fluidos).

Brevemente se aislaron mitocondrias de hígado según el protocolo descrito por Frezza y colaboradores [722] y se cuantificó la proteína mitocondrial obtenida.

En algunos casos se ha procedido a reducir o aumentar la concentración de colesterol mitocondrial.

### *Reducción del colesterol*

Para reducir el colesterol se incubaron muestras de mitocondrias con methyl- $\beta$ -cyclodextrin (Sigma C4555) 4mM durante 5' a temperatura ambiente. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 7000G durante 10' y se siguió el protocolo como el resto de muestras.

### *Enriquecimiento en colesterol*

Para incrementar el colesterol mitocondrial se incubó 1mg de proteína mitocondrial con **solución de enriquecimiento con colesterol** (ver versión en CD) durante 10' a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 7000G durante 10' y se siguió el protocolo como el resto de muestras.

Posteriormente se procede a la tinción de las mitocondrias con Di-4-ANEPPDHQ o Mitotracker DeepRed. Para ello se incuban 2ng/ $\mu$ l de proteína mitocondrial en 500 $\mu$ l de PBS con 1 $\mu$ g/ml Di-4-ANEPPDHQ o 250nM Mitotracker DeepRed a 37°C durante 10'.

Finalmente se lee en el citómetro una dilución 1/100 en PBS de las muestras anteriores. Las mitocondrias teñidas con Mitotracker-Deep red (Invitrogen M22426) son seleccionadas en el citómetro usando el láser 633nm y filtro 660/20. La tinción con este marcador nos permite detectar las mitocondrias y así, seleccionar la región del diagrama de puntos de FSC-A/SSC-A correspondiente a estos orgánulos.

Posteriormente, se analiza la fluorescencia de di-4-ANEPPDHQ de las partículas de esta región, excitando con el láser 488nm y recogiendo la emisión en los filtros 530/30 y 670/20. A partir de estos valores se calculó para cada partícula el índice general de polarización (GP) =  $(I_{530/30} - I_{670LP}) / (I_{530/30} + I_{670LP})$ , calculándose seguidamente el GP promedio de todas las partículas. Los valores de GP se encuentran entre -1 (membranas muy fluidas) y 1 (membranas muy condensadas).

(Protocolo detallado en la versión en CD)



---

# REFERENCIAS



1. Murphy, D.J., The dynamic roles of intracellular lipid droplets: from archaea to mammals. *Protoplasma*, 2012. 249(3): p. 541-85.
2. Greenberg, A.S., et al., Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *J Biol Chem*, 1991. 266(17): p. 11341-6.
3. Suzuki, M., et al., Lipid droplets: size matters. *J Electron Microscop (Tokyo)*, 2011. 60 Suppl 1: p. S101-16.
4. Waltermann, M. and A. Steinbuchel, Neutral lipid bodies in prokaryotes: recent insights into structure, formation, and relationship to eukaryotic lipid depots. *J Bacteriol*, 2005. 187(11): p. 3607-19.
5. Palacpac, N.M., et al., Developmental-stage-specific triacylglycerol biosynthesis, degradation and trafficking as lipid bodies in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Cell Sci*, 2004. 117(Pt 8): p. 1469-80.
6. Zheng, P., et al., A phenylalanine in DGAT is a key determinant of oil content and composition in maize. *Nat Genet*, 2008. 40(3): p. 367-72.
7. Andrianov, V., et al., Tobacco as a production platform for biofuel: overexpression of *Arabidopsis* DGAT and LEC2 genes increases accumulation and shifts the composition of lipids in green biomass. *Plant Biotechnol J*, 2010. 8(3): p. 277-87.
8. Walther, T.C. and R.V. Farese, Jr., Lipid droplets and cellular lipid metabolism. *Annu Rev Biochem*, 2012. 81: p. 687-714.
9. Bago, B., et al., Translocation and utilization of fungal storage lipid in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiol*, 2002. 128(1): p. 108-24.
10. Kuhnlein, R.P., Thematic review series: Lipid droplet synthesis and metabolism: from yeast to man. Lipid droplet-based storage fat metabolism in *Drosophila*. *J Lipid Res*, 2012. 53(8): p. 1430-6.
11. O'Rourke, E.J., et al., *C. elegans* major fats are stored in vesicles distinct from lysosome-related organelles. *Cell Metab*, 2009. 10(5): p. 430-5.
12. Zhang, S.O., et al., Lipid droplets as ubiquitous fat storage organelles in *C. elegans*. *BMC Cell Biol*, 2010. 11: p. 96.
13. Mak, H.Y., Lipid droplets as fat storage organelles in *Caenorhabditis elegans*: Thematic Review Series: Lipid Droplet Synthesis and Metabolism: from Yeast to Man. *J Lipid Res*, 2012. 53(1): p. 28-33.
14. Fujimoto, T. and R.G. Parton, Not just fat: the structure and function of the lipid droplet. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011. 3(3).
15. Digel, M., R. Ehehalt, and J. Fullekrug, Lipid droplets lighting up: insights from live microscopy. *FEBS Lett*, 2010. 584(11): p. 2168-75.
16. Wang, L., et al., Specific Accumulation of Lipid Droplets in Hepatocyte Nuclei of PFOA-exposed BALB/c Mice. *Sci Rep*, 2013. 3: p. 2174.
17. Layerenza, J.P., et al., Nuclear lipid droplets: a novel nuclear domain. *Biochim Biophys Acta*, 2013. 1831(2): p. 327-40.
18. Uzbekov, R. and P. Roingeard, Nuclear lipid droplets identified by electron microscopy of serial sections. *BMC Res Notes*, 2013. 6(1): p. 386.
19. Tauchi-Sato, K., et al., The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty Acid composition. *J Biol Chem*, 2002. 277(46): p. 44507-12.
20. Bartz, R., et al., Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic. *J Lipid Res*, 2007. 48(4): p. 837-47.
21. Prattes, S., et al., Intracellular distribution and mobilization of unesterified cholesterol in adipocytes: triglyceride droplets are surrounded by cholesterol-rich ER-like surface layer structures. *J Cell Sci*, 2000. 113 ( Pt 17): p. 2977-89.
22. Penno, A., G. Hackenbroich, and C. Thiele, Phospholipids and lipid droplets. *Biochim Biophys Acta*, 2013. 1831(3): p. 589-94.
23. Guo, Y., et al., Functional genomic screen reveals genes involved in lipid-droplet formation and utilization. *Nature*, 2008. 453(7195): p. 657-61.

24. Krahmer, N., et al., Phosphatidylcholine synthesis for lipid droplet expansion is mediated by localized activation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase. *Cell Metab*, 2011. 14(4): p. 504-15.
25. Moessinger, C., et al., Human lysophosphatidylcholine acyltransferases 1 and 2 are located in lipid droplets where they catalyze the formation of phosphatidylcholine. *J Biol Chem*, 2011. 286(24): p. 21330-9.
26. Fei, W., et al., A role for phosphatidic acid in the formation of "supersized" lipid droplets. *PLoS Genet*, 2011. 7(7): p. e1002201.
27. Bostrom, P., et al., SNARE proteins mediate fusion between cytosolic lipid droplets and are implicated in insulin sensitivity. *Nat Cell Biol*, 2007. 9(11): p. 1286-93.
28. Yang, H., et al., Controlling the size of lipid droplets: lipid and protein factors. *Curr Opin Cell Biol*, 2012. 24(4): p. 509-16.
29. Saito, H., et al., Coalescence of Lipid Emulsions in Floating and Freeze-Thawing Processes: Examination of the Coalescence Transition State Theory. *J Colloid Interface Sci*, 1999. 219(1): p. 129-134.
30. Horl, G., et al., Sequential synthesis and methylation of phosphatidylethanolamine promote lipid droplet biosynthesis and stability in tissue culture and in vivo. *J Biol Chem*, 2011. 286(19): p. 17338-50.
31. Storey, S.M., et al., The phospholipid monolayer associated with perilipin-enriched lipid droplets is a highly organized rigid membrane structure. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2011. 301(5): p. E991-E1003.
32. Arisawa, K., et al., Changes in the phospholipid fatty acid composition of the lipid droplet during the differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *J Biochem*, 2013. 154(3): p. 281-9.
33. Jackowski, S., J. Wang, and I. Baburina, Activity of the phosphatidylcholine biosynthetic pathway modulates the distribution of fatty acids into glycerolipids in proliferating cells. *Biochim Biophys Acta*, 2000. 1483(3): p. 301-15.
34. Jacobs, R.L., et al., Targeted deletion of hepatic CTP:phosphocholine cytidyltransferase alpha in mice decreases plasma high density and very low density lipoproteins. *J Biol Chem*, 2004. 279(45): p. 47402-10.
35. Lagace, T.A. and N.D. Ridgway, The role of phospholipids in the biological activity and structure of the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta*, 2013. 1833(11): p. 2499-510.
36. Lehner, R., Z. Cui, and D.E. Vance, Subcellular localization, developmental expression and characterization of a liver triacylglycerol hydrolase. *Biochem J*, 1999. 338 ( Pt 3): p. 761-8.
37. Ruggles, K.V., A. Turkish, and S.L. Sturley, Making, baking, and breaking: the synthesis, storage, and hydrolysis of neutral lipids. *Annu Rev Nutr*, 2013. 33: p. 413-51.
38. Cheng, J., et al., Quantitative electron microscopy shows uniform incorporation of triglycerides into existing lipid droplets. *Histochem Cell Biol*, 2009. 132(3): p. 281-91.
39. Czabany, T., et al., Structural and biochemical properties of lipid particles from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 2008. 283(25): p. 17065-74.
40. Melo, R.C., et al., The internal architecture of leukocyte lipid body organelles captured by three-dimensional electron microscopy tomography. *PLoS One*, 2013. 8(3): p. e59578.
41. Robenek, H., M.J. Robenek, and D. Troyer, PAT family proteins pervade lipid droplet cores. *J Lipid Res*, 2005. 46(6): p. 1331-8.
42. Fujimoto, T., et al., Lipid droplets: a classic organelle with new outfits. *Histochem Cell Biol*, 2008. 130(2): p. 263-79.
43. Thiele, C. and J. Spandl, Cell biology of lipid droplets. *Curr Opin Cell Biol*, 2008. 20(4): p. 378-85.
44. Wendel, A.A., T.M. Lewin, and R.A. Coleman, Glycerol-3-phosphate acyltransferases: rate limiting enzymes of triacylglycerol biosynthesis. *Biochim Biophys Acta*, 2009. 1791(6): p. 501-6.
45. Coleman, R.A. and D.P. Lee, Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog Lipid Res*, 2004. 43(2): p. 134-76.
46. Wiffling, F., et al., Triacylglycerol synthesis enzymes mediate lipid droplet growth by relocalizing from the ER

- to lipid droplets. *Dev Cell*, 2013. 24(4): p. 384-99.
47. Takeuchi, K. and K. Reue, Biochemistry, physiology, and genetics of GPAT, AGPAT, and lipin enzymes in triglyceride synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009. 296(6): p. E1195-209.
  48. Sim, M.F., et al., The human lipodystrophy protein seipin is an ER membrane adaptor for the adipogenic PA phosphatase lipin 1. *Mol Metab*, 2012. 2(1): p. 38-46.
  49. Wang, H., et al., Lipin-1gamma isoform is a novel lipid droplet-associated protein highly expressed in the brain. *FEBS Lett*, 2011. 585(12): p. 1979-84.
  50. Valdearcos, M., et al., Subcellular localization and role of lipin-1 in human macrophages. *J Immunol*, 2011. 186(10): p. 6004-13.
  51. Krahrer, N., R.V. Farese, Jr., and T.C. Walther, Balancing the fat: lipid droplets and human disease. *EMBO Mol Med*, 2013. 5(7): p. 905-15.
  52. Cai, J., et al., Diacylglycerol kinases as sources of phosphatidic acid. *Biochim Biophys Acta*, 2009. 1791(9): p. 942-8.
  53. Stone, S.J., et al., 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*, 2009. 284(8): p. 5352-61.
  54. Zammit, V.A., Hepatic triacylglycerol synthesis and secretion: DGAT2 as the link between glycaemia and triglyceridaemia. *Biochem J*, 2013. 451(1): p. 1-12.
  55. Kuerschner, L., C. Moessinger, and C. Thiele, Imaging of lipid biosynthesis: how a neutral lipid enters lipid droplets. *Traffic*, 2008. 9(3): p. 338-52.
  56. McFie, P.J., et al., 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*, 2011. 286(32): p. 28235-46.
  57. Wurie, H.R., L. Buckett, and V.A. Zammit, Diacylglycerol acyltransferase 2 acts upstream of diacylglycerol acyltransferase 1 and utilizes nascent diglycerides and de novo synthesized fatty acids in HepG2 cells. *FEBS J*, 2012. 279(17): p. 3033-47.
  58. Wurie, H.R., L. Buckett, and V.A. Zammit, Evidence that diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) has dual membrane topology in the endoplasmic reticulum of HepG2 cells. *J Biol Chem*, 2011. 286(42): p. 36238-47.
  59. Lee, B., et al., Intestine-specific expression of acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase 1 reverses resistance to diet-induced hepatic steatosis and obesity in *Dgat1*<sup>-/-</sup> mice. *J Lipid Res*, 2010. 51(7): p. 1770-80.
  60. Harris, C.A., et al., DGAT enzymes are required for triacylglycerol synthesis and lipid droplets in adipocytes. *J Lipid Res*, 2011. 52(4): p. 657-67.
  61. Lehner, R. and A. Kuksis, Triacylglycerol synthesis by an sn-1,2(2,3)-diacylglycerol transacylase from rat intestinal microsomes. *J Biol Chem*, 1993. 268(12): p. 8781-6.
  62. Chang, T.Y., et al., Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferases. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009. 297(1): p. E1-9.
  63. Kellner-Weibel, G., et al., Evidence that newly synthesized esterified cholesterol is deposited in existing cytoplasmic lipid inclusions. *J Lipid Res*, 2001. 42(5): p. 768-77.
  64. Jiang, W. and J.L. Napoli, Reorganization of cellular retinol-binding protein type 1 and lecithin:retinol acyltransferase during retinyl ester biosynthesis. *Biochim Biophys Acta*, 2012. 1820(7): p. 859-69.
  65. Ding, Y., et al., Proteomic profiling of lipid droplet-associated proteins in primary adipocytes of normal and obese mouse. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2012. 44(5): p. 394-406.
  66. Brasaemle, D.L., et al., Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, 2004. 279(45): p. 46835-42.
  67. Zhang, H., et al., Proteome of skeletal muscle lipid droplet reveals association with mitochondria and apolipoprotein a-I. *J Proteome Res*, 2011. 10(10): p. 4757-68.
  68. Beilstein, F., et al., Proteomic analysis of lipid droplets from *Caco-2/TC7* enterocytes identifies novel modulators of lipid secretion. *PLoS One*, 2013. 8(1): p. e53017.

69. Fujimoto, Y., et al., Identification of major proteins in the lipid droplet-enriched fraction isolated from the human hepatocyte cell line HuH7. *Biochim Biophys Acta*, 2004. 1644(1): p. 47-59.
70. Turro, S., et al., Identification and characterization of associated with lipid droplet protein 1: A novel membrane-associated protein that resides on hepatic lipid droplets. *Traffic*, 2006. 7(9): p. 1254-69.
71. Larsson, S., et al., Characterization of the lipid droplet proteome of a clonal insulin-producing beta-cell line (INS-1 832/13). *J Proteome Res*, 2012. 11(2): p. 1264-73.
72. Umlauf, E., et al., Association of stomatin with lipid bodies. *J Biol Chem*, 2004. 279(22): p. 23699-709.
73. Liu, P., et al., Chinese hamster ovary K2 cell lipid droplets appear to be metabolic organelles involved in membrane traffic. *J Biol Chem*, 2004. 279(5): p. 3787-92.
74. Bartz, R., et al., Dynamic activity of lipid droplets: protein phosphorylation and GTP-mediated protein translocation. *J Proteome Res*, 2007. 6(8): p. 3256-65.
75. Zehmer, J.K., et al., A role for lipid droplets in inter-membrane lipid traffic. *Proteomics*, 2009. 9(4): p. 914-21.
76. Welte, M.A., Proteins under new management: lipid droplets deliver. *Trends Cell Biol*, 2007. 17(8): p. 363-9.
77. Wang, H., et al., Activation of hormone-sensitive lipase requires two steps, protein phosphorylation and binding to the PAT-1 domain of lipid droplet coat proteins. *J Biol Chem*, 2009. 284(46): p. 32116-25.
78. Kimmel, A.R., et al., Adoption of PERILIPIN as a unifying nomenclature for the mammalian PAT-family of intracellular lipid storage droplet proteins. *J Lipid Res*, 2010. 51(3): p. 468-71.
79. Bickel, P.E., J.T. Tansey, and M.A. Welte, PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. *Biochim Biophys Acta*, 2009. 1791(6): p. 419-40.
80. Straub, B.K., et al., Differential pattern of lipid droplet-associated proteins and de novo perilipin expression in hepatocyte steatogenesis. *Hepatology*, 2008. 47(6): p. 1936-46.
81. Zhao, B., et al., Redistribution of macrophage cholesteryl ester hydrolase from cytoplasm to lipid droplets upon lipid loading. *J Lipid Res*, 2005. 46(10): p. 2114-21.
82. Straub, B.K., et al., Lipid droplet-associated PAT-proteins show frequent and differential expression in neoplastic steatogenesis. *Mod Pathol*, 2010. 23(3): p. 480-92.
83. Dichlberger, A., et al., Lipid body formation during maturation of human mast cells. *J Lipid Res*, 2011. 52(12): p. 2198-208.
84. Xu, G., C. Sztalryd, and C. Londos, Degradation of perilipin is mediated through ubiquitination-proteasome pathway. *Biochim Biophys Acta*, 2006. 1761(1): p. 83-90.
85. Skinner, J.R., et al., Perilipin 1 moves between the fat droplet and the endoplasmic reticulum. *Adipocyte*, 2013. 2(2): p. 80-6.
86. Langlois, D., et al., Increased atherosclerosis in mice deficient in perilipin1. *Lipids Health Dis*, 2011. 10: p. 169.
87. McIntosh, A.L., et al., Direct interaction of Plin2 with lipids on the surface of lipid droplets: a live cell FRET analysis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2012. 303(7): p. C728-42.
88. Fan, B., et al., Oleic acid-induced ADRP expression requires both AP-1 and PPAR response elements, and is reduced by Pycnogenol through mRNA degradation in NMuLi liver cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009. 297(1): p. E112-23.
89. Masuda, Y., et al., ADRP/adipophilin is degraded through the proteasome-dependent pathway during regression of lipid-storing cells. *J Lipid Res*, 2006. 47(1): p. 87-98.
90. Xu, G., et al., Post-translational regulation of adipose differentiation-related protein by the ubiquitin/proteasome pathway. *J Biol Chem*, 2005. 280(52): p. 42841-7.
91. Listenberger, L.L., et al., Adipocyte differentiation-related protein reduces the lipid droplet association of adipose triglyceride lipase and slows triacylglycerol turnover. *J Lipid Res*, 2007. 48(12): p. 2751-61.
92. Magnusson, B., et al., Adipocyte differentiation-related protein promotes fatty acid storage in cytosolic triglycerides and inhibits secretion of very low-density lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. 26(7): p.

- 1566-71.
93. Martin, S. and R.G. Parton, Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. 7(5): p. 373-8.
  94. Bosma, M., et al., Perilipin 2 improves insulin sensitivity in skeletal muscle despite elevated intramuscular lipid levels. *Diabetes*, 2012. 61(11): p. 2679-90.
  95. Kohjima, M., et al., Delayed Liver Regeneration after Partial Hepatectomy in Adipose Differentiation Related Protein-null Mice. *J Hepatol*, 2013.
  96. Wolins, N.E., B. Rubin, and D.L. Brasaemle, TIP47 associates with lipid droplets. *J Biol Chem*, 2001. 276(7): p. 5101-8.
  97. Skinner, J.R., et al., Diacylglycerol enrichment of endoplasmic reticulum or lipid droplets recruits perilipin 3/ TIP47 during lipid storage and mobilization. *J Biol Chem*, 2009. 284(45): p. 30941-8.
  98. Bell, M., et al., Consequences of lipid droplet coat protein downregulation in liver cells: abnormal lipid droplet metabolism and induction of insulin resistance. *Diabetes*, 2008. 57(8): p. 2037-45.
  99. Bulankina, A.V., et al., TIP47 functions in the biogenesis of lipid droplets. *J Cell Biol*, 2009. 185(4): p. 641-55.
  100. Carr, R.M., et al., Reduction of TIP47 improves hepatic steatosis and glucose homeostasis in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2012. 302(8): p. R996-1003.
  101. Wolins, N.E., et al., Adipocyte protein S3-12 coats nascent lipid droplets. *J Biol Chem*, 2003. 278(39): p. 37713-21.
  102. Sztalryd, C., et al., Functional compensation for adipose differentiation-related protein (ADFP) by Tip47 in an ADFP null embryonic cell line. *J Biol Chem*, 2006. 281(45): p. 34341-8.
  103. Hsieh, K., et al., Perilipin family members preferentially sequester to either triacylglycerol-specific or cholesteryl-ester-specific intracellular lipid storage droplets. *J Cell Sci*, 2012. 125(Pt 17): p. 4067-76.
  104. Wolins, N.E., D.L. Brasaemle, and P.E. Bickel, A proposed model of fat packaging by exchangeable lipid droplet proteins. *FEBS Lett*, 2006. 580(23): p. 5484-91.
  105. Lee, B., et al., Differential association of adipophilin and TIP47 proteins with cytoplasmic lipid droplets in mouse enterocytes during dietary fat absorption. *Biochim Biophys Acta*, 2009. 1791(12): p. 1173-80.
  106. Martin, S. and R.G. Parton, Caveolin, cholesterol, and lipid bodies. *Semin Cell Dev Biol*, 2005. 16(2): p. 163-74.
  107. Parton, R.G. and M.A. del Pozo, Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013. 14(2): p. 98-112.
  108. Le Lay, S. and T.V. Kurzchalia, Getting rid of caveolins: phenotypes of caveolin-deficient animals. *Biochim Biophys Acta*, 2005. 1746(3): p. 322-33.
  109. Pilch, P.F. and L. Liu, Fat caves: caveolae, lipid trafficking and lipid metabolism in adipocytes. *Trends Endocrinol Metab*, 2011. 22(8): p. 318-24.
  110. Bosch, M., et al., Mitochondrial cholesterol: a connection between caveolin, metabolism, and disease. *Traffic*, 2011. 12(11): p. 1483-9.
  111. Trigatti, B.L., R.G. Anderson, and G.E. Gerber, Identification of caveolin-1 as a fatty acid binding protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. 255(1): p. 34-9.
  112. Murata, M., et al., VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(22): p. 10339-43.
  113. Le Lay, S., et al., Cholesterol-induced caveolin targeting to lipid droplets in adipocytes: a role for caveolar endocytosis. *Traffic*, 2006. 7(5): p. 549-61.
  114. Pol, A., et al., Cholesterol and fatty acids regulate dynamic caveolin trafficking through the Golgi complex and between the cell surface and lipid bodies. *Mol Biol Cell*, 2005. 16(4): p. 2091-105.
  115. Pol, A., et al., Dynamic and regulated association of caveolin with lipid bodies: modulation of lipid body motility and function by a dominant negative mutant. *Mol Biol Cell*, 2004. 15(1): p. 99-110.
  116. Fujimoto, T., et al., Caveolin-2 is targeted to lipid droplets, a new "membrane domain" in the cell. *J Cell Biol*, 2001. 152(5): p. 1079-85.

117. Pol, A., et al., A caveolin dominant negative mutant associates with lipid bodies and induces intracellular cholesterol imbalance. *J Cell Biol*, 2001. 152(5): p. 1057-70.
118. Le Lay, S., et al., Filling up adipocytes with lipids. Lessons from caveolin-1 deficiency. *Biochim Biophys Acta*, 2009. 1791(6): p. 514-8.
119. Blouin, C.M., et al., Regulated association of caveolins to lipid droplets during differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. 376(2): p. 331-5.
120. Meshulam, T., et al., Caveolins/caveolae protect adipocytes from fatty acid-mediated lipotoxicity. *J Lipid Res*, 2011. 52(8): p. 1526-32.
121. Ostermeyer, A.G., et al., Accumulation of caveolin in the endoplasmic reticulum redirects the protein to lipid storage droplets. *J Cell Biol*, 2001. 152(5): p. 1071-8.
122. Nevalainen, M., et al., Reversible stress-induced lipid body formation in fast twitch rat myofibers. *Exp Cell Res*, 2012. 318(17): p. 2191-9.
123. Simard, J.R., et al., Caveolins sequester FA on the cytoplasmic leaflet of the plasma membrane, augment tri-glyceride formation, and protect cells from lipotoxicity. *J Lipid Res*, 2010. 51(5): p. 914-22.
124. Fernandez, M.A., et al., Caveolin-1 is essential for liver regeneration. *Science*, 2006. 313(5793): p. 1628-32.
125. Fernandez-Rojo, M.A., et al., Caveolin-1 orchestrates the balance between glucose and lipid-dependent energy metabolism: implications for liver regeneration. *Hepatology*, 2012. 55(5): p. 1574-84.
126. Shteyer, E., et al., Disruption of hepatic adipogenesis is associated with impaired liver regeneration in mice. *Hepatology*, 2004. 40(6): p. 1322-32.
127. Ring, A., et al., Caveolin-1 is required for fatty acid translocase (FAT/CD36) localization and function at the plasma membrane of mouse embryonic fibroblasts. *Biochim Biophys Acta*, 2006. 1761(4): p. 416-23.
128. Ost, A., et al., Triacylglycerol is synthesized in a specific subclass of caveolae in primary adipocytes. *J Biol Chem*, 2005. 280(1): p. 5-8.
129. Blouin, C.M., et al., Lipid droplet analysis in caveolin-deficient adipocytes: alterations in surface phospholipid composition and maturation defects. *J Lipid Res*, 2010. 51(5): p. 945-56.
130. Le Lay, S., et al., The lipotrophic caveolin-1 deficient mouse model reveals autophagy in mature adipocytes. *Autophagy*, 2010. 6(6): p. 754-63.
131. Martin, S., et al., Caveolin-1 deficiency leads to increased susceptibility to cell death and fibrosis in white adipose tissue: characterization of a lipodystrophic model. *PLoS One*, 2012. 7(9): p. e46242.
132. Razani, B. and M.P. Lisanti, Two distinct caveolin-1 domains mediate the functional interaction of caveolin-1 with protein kinase A. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001. 281(4): p. C1241-50.
133. Cohen, A.W., et al., Role of caveolin-1 in the modulation of lipolysis and lipid droplet formation. *Diabetes*, 2004. 53(5): p. 1261-70.
134. Mattsson, C.L., E.R. Andersson, and J. Nedergaard, Differential involvement of caveolin-1 in brown adipocyte signaling: impaired beta3-adrenergic, but unaffected LPA, PDGF and EGF receptor signaling. *Biochim Biophys Acta*, 2010. 1803(8): p. 983-9.
135. Hill, M.M., et al., PTRF-Cavin, a conserved cytoplasmic protein required for caveola formation and function. *Cell*, 2008. 132(1): p. 113-24.
136. Liu, L. and P.F. Pilch, A critical role of cavin (polymerase I and transcript release factor) in caveolae formation and organization. *J Biol Chem*, 2008. 283(7): p. 4314-22.
137. Aboulaich, N., et al., Association and insulin regulated translocation of hormone-sensitive lipase with PTRF. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. 350(3): p. 657-61.
138. Li, L.O., E.L. Klett, and R.A. Coleman, Acyl-CoA synthesis, lipid metabolism and lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta*, 2010. 1801(3): p. 246-51.
139. Saraswathi, V. and A.H. Hasty, Inhibition of long-chain acyl coenzyme A synthetases during fatty acid loading induces lipotoxicity in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009. 29(11): p. 1937-43.
140. Watkins, P.A., et al., Evidence for 26 distinct acyl-coenzyme A synthetase genes in the human genome. *J*

- Lipid Res, 2007. 48(12): p. 2736-50.
141. Fullekrug, J., R. Ehehalt, and M. Poppelreuther, Outlook: membrane junctions enable the metabolic trapping of fatty acids by intracellular acyl-CoA synthetases. *Front Physiol*, 2012. 3: p. 401.
  142. Van Horn, C.G., et al., Characterization of recombinant long-chain rat acyl-CoA synthetase isoforms 3 and 6: identification of a novel variant of isoform 6. *Biochemistry*, 2005. 44(5): p. 1635-42.
  143. Fujino, T., et al., Molecular characterization and expression of rat acyl-CoA synthetase 3. *J Biol Chem*, 1996. 271(28): p. 16748-52.
  144. Suzuki, H., et al., Structure and regulation of rat long-chain acyl-CoA synthetase. *J Biol Chem*, 1990. 265(15): p. 8681-5.
  145. Kang, M.J., et al., A novel arachidonate-preferring acyl-CoA synthetase is present in steroidogenic cells of the rat adrenal, ovary, and testis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(7): p. 2880-4.
  146. Golej, D.L., et al., Long-chain acyl-CoA synthetase 4 modulates prostaglandin E(2) release from human arterial smooth muscle cells. *J Lipid Res*, 2011. 52(4): p. 782-93.
  147. Marszalek, J.R., et al., Long-chain acyl-CoA synthetase 6 preferentially promotes DHA metabolism. *J Biol Chem*, 2005. 280(11): p. 10817-26.
  148. Jaworski, K., et al., AdPLA ablation increases lipolysis and prevents obesity induced by high-fat feeding or leptin deficiency. *Nat Med*, 2009. 15(2): p. 159-68.
  149. Maloberti, P., et al., Silencing the expression of mitochondrial acyl-CoA thioesterase I and acyl-CoA synthetase 4 inhibits hormone-induced steroidogenesis. *FEBS J*, 2005. 272(7): p. 1804-14.
  150. Soupene, E. and F.A. Kuypers, Multiple erythroid isoforms of human long-chain acyl-CoA synthetases are produced by switch of the fatty acid gate domains. *BMC Mol Biol*, 2006. 7: p. 21.
  151. Digel, M., et al., Acyl-CoA synthetases: fatty acid uptake and metabolic channeling. *Mol Cell Biochem*, 2009. 326(1-2): p. 23-8.
  152. Li, L.O., et al., Overexpression of rat long chain acyl-coa synthetase 1 alters fatty acid metabolism in rat primary hepatocytes. *J Biol Chem*, 2006. 281(48): p. 37246-55.
  153. Bu, S.Y. and D.G. Mashek, Hepatic long-chain acyl-CoA synthetase 5 mediates fatty acid channeling between anabolic and catabolic pathways. *J Lipid Res*, 2010. 51(11): p. 3270-80.
  154. Mashek, D.G., et al., Rat long chain acyl-CoA synthetase 5 increases fatty acid uptake and partitioning to cellular triacylglycerol in McArdle-RH7777 cells. *J Biol Chem*, 2006. 281(2): p. 945-50.
  155. Li, L.O., et al., Liver-specific loss of long chain acyl-CoA synthetase-1 decreases triacylglycerol synthesis and beta-oxidation and alters phospholipid fatty acid composition. *J Biol Chem*, 2009. 284(41): p. 27816-26.
  156. Yao, H. and J. Ye, Long chain acyl-CoA synthetase 3-mediated phosphatidylcholine synthesis is required for assembly of very low density lipoproteins in human hepatoma Huh7 cells. *J Biol Chem*, 2008. 283(2): p. 849-54.
  157. Lewin, T.M., et al., 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*, 2002. 404(2): p. 263-70.
  158. Poppelreuther, M., et al., The N-terminal region of acyl-CoA synthetase 3 is essential for both the localization on lipid droplets and the function in fatty acid uptake. *J Lipid Res*, 2012. 53(5): p. 888-900.
  159. Lewin, T.M., et al., Acyl-CoA synthetase isoforms 1, 4, and 5 are present in different subcellular membranes in rat liver and can be inhibited independently. *J Biol Chem*, 2001. 276(27): p. 24674-9.
  160. Distler, A.M., J. Kerner, and C.L. Hoppel, Post-translational modifications of rat liver mitochondrial outer membrane proteins identified by mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta*, 2007. 1774(5): p. 628-36.
  161. Milger, K., et al., Cellular uptake of fatty acids driven by the ER-localized acyl-CoA synthetase FATP4. *J Cell Sci*, 2006. 119(Pt 22): p. 4678-88.
  162. Krammer, J., et al., Overexpression of CD36 and acyl-CoA synthetases FATP2, FATP4 and ACSL1 increases fatty acid uptake in human hepatoma cells. *Int J Med Sci*, 2011. 8(7): p. 599-614.
  163. Zhan, T., et al., Overexpressed FATP1, ACSVL4/FATP4 and ACSL1 increase the cellular fatty acid up-



- take of 3T3-L1 adipocytes but are localized on intracellular membranes. *PLoS One*, 2012. 7(9): p. e45087.
164. Gargiulo, C.E., S.M. Stuhlsatz-Krouper, and J.E. Schaffer, Localization of adipocyte long-chain fatty acyl-CoA synthetase at the plasma membrane. *J Lipid Res*, 1999. 40(5): p. 881-92.
  165. Richards, M.R., et al., Fatty acid transport protein 1 and long-chain acyl coenzyme A synthetase 1 interact in adipocytes. *J Lipid Res*, 2006. 47(3): p. 665-72.
  166. Lobo, S., B.M. Wiczer, and D.A. Bernlohr, Functional analysis of long-chain acyl-CoA synthetase 1 in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, 2009. 284(27): p. 18347-56.
  167. Fujino, T., et al., Alternative translation initiation generates acyl-CoA synthetase 3 isoforms with heterogeneous amino termini. *J Biochem*, 1997. 122(1): p. 212-6.
  168. Fujimoto, Y., et al., Involvement of ACSL in local synthesis of neutral lipids in cytoplasmic lipid droplets in human hepatocyte HuH7. *J Lipid Res*, 2007. 48(6): p. 1280-92.
  169. Kaemmerer, E., et al., Human intestinal acyl-CoA synthetase 5 is sensitive to the inhibitor triacsin C. *World J Gastroenterol*, 2011. 17(44): p. 4883-9.
  170. Igal, R.A., P. Wang, and R.A. Coleman, 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*, 1997. 324 ( Pt 2): p. 529-34.
  171. Muoio, D.M., et al., Acyl-CoAs are functionally channeled in liver: potential role of acyl-CoA synthetase. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2000. 279(6): p. E1366-73.
  172. Brasaemle, D.L., et al., Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis. *J Biol Chem*, 2000. 275(49): p. 38486-93.
  173. Parkes, H.A., et al., Overexpression of acyl-CoA synthetase-1 increases lipid deposition in hepatic (HepG2) cells and rodent liver in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006. 291(4): p. E737-44.
  174. Mukherjee, R. and J.W. Yun, Long chain acyl CoA synthetase 1 and gelsolin are oppositely regulated in adipogenesis and lipogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012. 420(3): p. 588-93.
  175. Ellis, J.M., et al., Adipose acyl-CoA synthetase-1 directs fatty acids toward beta-oxidation and is required for cold thermogenesis. *Cell Metab*, 2010. 12(1): p. 53-64.
  176. Kanter, J.E., et al., Diabetes promotes an inflammatory macrophage phenotype and atherosclerosis through acyl-CoA synthetase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. 109(12): p. E715-24.
  177. Souza, S.C., et al., Modulation of hormone-sensitive lipase and protein kinase A-mediated lipolysis by perilipin A in an adenoviral reconstituted system. *J Biol Chem*, 2002. 277(10): p. 8267-72.
  178. Ellis, J.M., et al., Mouse cardiac acyl coenzyme a synthetase 1 deficiency impairs Fatty Acid oxidation and induces cardiac hypertrophy. *Mol Cell Biol*, 2011. 31(6): p. 1252-62.
  179. Lee, K., J. Kerner, and C.L. Hoppel, Mitochondrial carnitine palmitoyltransferase 1a (CPT1a) is part of an outer membrane fatty acid transfer complex. *J Biol Chem*, 2011. 286(29): p. 25655-62.
  180. Liu, Q., et al., Activation of AMP-activated protein kinase signaling pathway by adiponectin and insulin in mouse adipocytes: requirement of acyl-CoA synthetases FATP1 and Acsl1 and association with an elevation in AMP/ATP ratio. *FASEB J*, 2010. 24(11): p. 4229-39.
  181. Zhou, Y., et al., Transcriptional activation of hepatic ACSL3 and ACSL5 by oncostatin m reduces hypertriglyceridemia through enhanced beta-oxidation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. 27(10): p. 2198-205.
  182. Wu, M., et al., Reduction of serum free fatty acids and triglycerides by liver-targeted expression of long chain acyl-CoA synthetase 3. *Int J Mol Med*, 2011. 27(5): p. 655-62.
  183. Chang, Y.S., et al., ACSL3 and GSK-3beta are essential for lipid upregulation induced by endoplasmic reticulum stress in liver cells. *J Cell Biochem*, 2011. 112(3): p. 881-93.
  184. Weedon-Fekjaer, M.S., et al., Activation of LXR increases acyl-CoA synthetase activity through direct regulation of ACSL3 in human placental trophoblast cells. *J Lipid Res*, 2010. 51(7): p. 1886-96.
  185. Bu, S.Y., M.T. Mashek, and D.G. Mashek, Suppression of long chain acyl-CoA synthetase 3 decreases hepatic de novo fatty acid synthesis through decreased transcriptional activity. *J Biol Chem*, 2009. 284(44): p. 30474-83.



186. Nakamura, N., Y. Banno, and K. Tamiya-Koizumi, Arf1-dependent PLD1 is localized to oleic acid-induced lipid droplets in NIH3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. 335(1): p. 117-23.
187. Bouvet, S., et al., Targeting of the Arf-GEF GBF1 to lipid droplets and Golgi membranes. *J Cell Sci*, 2013.
188. Hommel, A., et al., The ARF-like GTPase ARFRP1 is essential for lipid droplet growth and is involved in the regulation of lipolysis. *Mol Cell Biol*, 2010. 30(5): p. 1231-42.
189. Soni, K.G., et al., Coatamer-dependent protein delivery to lipid droplets. *J Cell Sci*, 2009. 122(Pt 11): p. 1834-41.
190. Nakamura, N., et al., ADRP is dissociated from lipid droplets by ARF1-dependent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. 322(3): p. 957-65.
191. Beller, M., et al., COPI complex is a regulator of lipid homeostasis. *PLoS Biol*, 2008. 6(11): p. e292.
192. Ellong, E.N., et al., Interaction between the triglyceride lipase ATGL and the Arf1 activator GBF1. *PLoS One*, 2011. 6(7): p. e21889.
193. Thiam, A.R., et al., COPI buds 60-nm lipid droplets from reconstituted water-phospholipid-triacylglyceride interfaces, suggesting a tension clamp function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. 110(33): p. 13244-9.
194. Unterstab, G., et al., The polyomavirus BK agnoprotein co-localizes with lipid droplets. *Virology*, 2010. 399(2): p. 322-31.
195. Hinson, E.R. and P. Cresswell, The antiviral protein, viperin, localizes to lipid droplets via its N-terminal amphipathic alpha-helix. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(48): p. 20452-7.
196. McIntosh, A.L., S.M. Storey, and B.P. Atshaves, Intracellular lipid droplets contain dynamic pools of sphingomyelin: ADRP binds phospholipids with high affinity. *Lipids*, 2010. 45(6): p. 465-77.
197. Subramanian, V., et al., Hydrophobic sequences target and anchor perilipin A to lipid droplets. *J Lipid Res*, 2004. 45(11): p. 1983-91.
198. Nakamura, N. and T. Fujimoto, Adipose differentiation-related protein has two independent domains for targeting to lipid droplets. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. 306(2): p. 333-8.
199. Boulant, S., et al., Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *J Biol Chem*, 2006. 281(31): p. 22236-47.
200. Farese, R.V., Jr. and T.C. Walther, Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T. *Cell*, 2009. 139(5): p. 855-60.
201. Horiguchi, Y., M. Araki, and K. Motojima, Identification and characterization of the ER/lipid droplet-targeting sequence in 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 11. *Arch Biochem Biophys*, 2008. 479(2): p. 121-30.
202. Hope, R.G., D.J. Murphy, and J. McLauchlan, The domains required to direct core proteins of hepatitis C virus and GB virus-B to lipid droplets share common features with plant oleosin proteins. *J Biol Chem*, 2002. 277(6): p. 4261-70.
203. Zehmer, J.K., et al., Identification of a novel N-terminal hydrophobic sequence that targets proteins to lipid droplets. *J Cell Sci*, 2008. 121(Pt 11): p. 1852-60.
204. Ingelmo-Torres, M., et al., Hydrophobic and basic domains target proteins to lipid droplets. *Traffic*, 2009. 10(12): p. 1785-801.
205. Abell, B.M., et al., Role of the proline knot motif in oleosin endoplasmic reticulum topology and oil body targeting. *Plant Cell*, 1997. 9(8): p. 1481-93.
206. Martins, I.C., et al., The disordered N-terminal region of dengue virus capsid protein contains a lipid-droplet-binding motif. *Biochem J*, 2012. 444(3): p. 405-15.
207. Stevanovic, A. and C. Thiele, Monotopic topology is required for lipid droplet targeting of ancient ubiquitous protein 1. *J Lipid Res*, 2013. 54(2): p. 503-13.
208. Jiang, W. and J.L. Napoli, The retinol dehydrogenase Rdh10 localizes to lipid droplets during acyl ester biosynthesis. *J Biol Chem*, 2013. 288(1): p. 589-97.
209. Zehmer, J.K., et al., Targeting sequences of UBXD8 and AAM-B reveal that the ER has a direct role in the

- emergence and regression of lipid droplets. *J Cell Sci*, 2009. 122(Pt 20): p. 3694-702.
210. Cermelli, S., et al., The lipid-droplet proteome reveals that droplets are a protein-storage depot. *Curr Biol*, 2006. 16(18): p. 1783-95.
  211. Jiang, H., et al., Heat shock protein 70 is translocated to lipid droplets in rat adipocytes upon heat stimulation. *Biochim Biophys Acta*, 2007. 1771(1): p. 66-74.
  212. Klemm, E.J., E. Spooner, and H.L. Ploegh, Dual role of ancient ubiquitous protein 1 (AUP1) in lipid droplet accumulation and endoplasmic reticulum (ER) protein quality control. *J Biol Chem*, 2011. 286(43): p. 37602-14.
  213. Jo, Y., I.Z. Hartman, and R.A. DeBose-Boyd, Ancient ubiquitous protein-1 mediates sterol-induced ubiquitination of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in lipid droplet-associated endoplasmic reticulum membranes. *Mol Biol Cell*, 2013. 24(3): p. 169-83.
  214. Spandl, J., et al., Ancient ubiquitous protein 1 (AUP1) localizes to lipid droplets and binds the E2 ubiquitin conjugase G2 (Ube2g2) via its G2 binding region. *J Biol Chem*, 2011. 286(7): p. 5599-606.
  215. Nian, Z., et al., Fat-specific protein 27 undergoes ubiquitin-dependent degradation regulated by triacylglycerol synthesis and lipid droplet formation. *J Biol Chem*, 2010. 285(13): p. 9604-15.
  216. Tokunaga, M., et al., Hereditary spastic paraplegia protein spartin is an FK506-binding protein identified by mRNA display. *Chem Biol*, 2013. 20(7): p. 935-42.
  217. Hooper, C., et al., Spartin activates atrophin-1-interacting protein 4 (AIP4) E3 ubiquitin ligase and promotes ubiquitination of adipophilin on lipid droplets. *BMC Biol*, 2010. 8: p. 72.
  218. Eastman, S.W., M. Yassaee, and P.D. Bieniasz, A role for ubiquitin ligases and Spartin/SPG20 in lipid droplet turnover. *J Cell Biol*, 2009. 184(6): p. 881-94.
  219. Edwards, T.L., et al., Endogenous spartin (SPG20) is recruited to endosomes and lipid droplets and interacts with the ubiquitin E3 ligases AIP4 and AIP5. *Biochem J*, 2009. 423(1): p. 31-9.
  220. Ohsaki, Y., et al., Cytoplasmic lipid droplets are sites of convergence of proteasomal and autophagic degradation of apolipoprotein B. *Mol Biol Cell*, 2006. 17(6): p. 2674-83.
  221. Dvorak, A.M., E.S. Morgan, and P.F. Weller, RNA is closely associated with human mast cell lipid bodies. *Histol Histopathol*, 2003. 18(3): p. 943-68.
  222. Wan, H.C., et al., Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies. *FASEB J*, 2007. 21(1): p. 167-78.
  223. Cho, S.Y., et al., Identification of mouse Prp19p as a lipid droplet-associated protein and its possible involvement in the biogenesis of lipid droplets. *J Biol Chem*, 2007. 282(4): p. 2456-65.
  224. Vickers, K.C., et al., MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol*, 2011. 13(4): p. 423-33.
  225. Khandelia, H., et al., Triglyceride blisters in lipid bilayers: implications for lipid droplet biogenesis and the mobile lipid signal in cancer cell membranes. *PLoS One*, 2010. 5(9): p. e12811.
  226. Brasaemle, D.L. and N.E. Wolins, Packaging of fat: an evolving model of lipid droplet assembly and expansion. *J Biol Chem*, 2012. 287(4): p. 2273-9.
  227. Chang, B.H., et al., Protection against fatty liver but normal adipogenesis in mice lacking adipose differentiation-related protein. *Mol Cell Biol*, 2006. 26(3): p. 1063-76.
  228. Gubern, A., et al., Group IVA phospholipase A2 is necessary for the biogenesis of lipid droplets. *J Biol Chem*, 2008. 283(41): p. 27369-82.
  229. Ploegh, H.L., A lipid-based model for the creation of an escape hatch from the endoplasmic reticulum. *Nature*, 2007. 448(7152): p. 435-8.
  230. Zanghellini, J., F. Wodlei, and H.H. von Grunberg, Phospholipid demixing and the birth of a lipid droplet. *J Theor Biol*, 2010. 264(3): p. 952-61.
  231. Gubern, A., et al., JNK and ceramide kinase govern the biogenesis of lipid droplets through activation of group IVA phospholipase A2. *J Biol Chem*, 2009. 284(47): p. 32359-69.
  232. Guijas, C., et al., 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*, 2012. 53(11): p. 2343-54.

233. Cabodevilla, A.G., et al., Cell Survival during Complete Nutrient Deprivation Depends on Lipid Droplet-fueled beta-Oxidation of Fatty Acids. *J Biol Chem*, 2013. 288(39): p. 27777-88.
234. Du, L., et al., Starving neurons show sex difference in autophagy. *J Biol Chem*, 2009. 284(4): p. 2383-96.
235. Adeyo, O., et al., The yeast lipin orthologue Pah1p is important for biogenesis of lipid droplets. *J Cell Biol*, 2011. 192(6): p. 1043-55.
236. Wang, H., et al., Altered lipid droplet dynamics in hepatocytes lacking triacylglycerol hydrolase expression. *Mol Biol Cell*, 2010. 21(12): p. 1991-2000.
237. Robenek, H., et al., Compartmentalization of proteins in lipid droplet biogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 2009. 1791(6): p. 408-18.
238. Robenek, H., et al., Adipophilin-enriched domains in the ER membrane are sites of lipid droplet biogenesis. *J Cell Sci*, 2006. 119(Pt 20): p. 4215-24.
239. Mackinnon, W.B., G.L. May, and C.E. Mountford, Esterified cholesterol and triglyceride are present in plasma membranes of Chinese hamster ovary cells. *Eur J Biochem*, 1992. 205(2): p. 827-39.
240. May, G.L., et al., Increased saturated triacylglycerol levels in plasma membranes of human neutrophils stimulated by lipopolysaccharide. *J Lipid Res*, 1997. 38(8): p. 1562-70.
241. Aboulaich, N., A.V. Vener, and P. Stralfors, Hormonal control of reversible translocation of perilipin B to the plasma membrane in primary human adipocytes. *J Biol Chem*, 2006. 281(17): p. 11446-9.
242. Robenek, H., et al., Lipid droplets gain PAT family proteins by interaction with specialized plasma membrane domains. *J Biol Chem*, 2005. 280(28): p. 26330-8.
243. Greenberg, A.S. and M.S. Obin, Many roads lead to the lipid droplet. *Cell Metab*, 2008. 7(6): p. 472-3.
244. Murphy, S., S. Martin, and R.G. Parton, Quantitative analysis of lipid droplet fusion: inefficient steady state fusion but rapid stimulation by chemical fusogens. *PLoS One*, 2010. 5(12): p. e15030.
245. Ariotti, N., et al., Postlipolytic insulin-dependent remodeling of micro lipid droplets in adipocytes. *Mol Biol Cell*, 2012. 23(10): p. 1826-37.
246. Ohsaki, Y., et al., Biogenesis of cytoplasmic lipid droplets: from the lipid ester globule in the membrane to the visible structure. *Biochim Biophys Acta*, 2009. 1791(6): p. 399-407.
247. Gong, J., et al., Fsp27 promotes lipid droplet growth by lipid exchange and transfer at lipid droplet contact sites. *J Cell Biol*, 2011. 195(6): p. 953-63.
248. Paar, M., et al., Remodeling of lipid droplets during lipolysis and growth in adipocytes. *J Biol Chem*, 2012. 287(14): p. 11164-73.
249. Yang, X., et al., Distinct mechanisms regulate ATGL-mediated adipocyte lipolysis by lipid droplet coat proteins. *Mol Endocrinol*, 2013. 27(1): p. 116-26.
250. Nishino, N., et al., FSP27 contributes to efficient energy storage in murine white adipocytes by promoting the formation of unilocular lipid droplets. *J Clin Invest*, 2008. 118(8): p. 2808-21.
251. Puri, V., et al., Fat-specific protein 27, a novel lipid droplet protein that enhances triglyceride storage. *J Biol Chem*, 2007. 282(47): p. 34213-8.
252. Ito, M., et al., Differential roles of CIDEA and CIDEC in insulin-induced anti-apoptosis and lipid droplet formation in human adipocytes. *J Lipid Res*, 2010. 51(7): p. 1676-84.
253. Grahn, T.H., et al., FSP27 and PLIN1 interaction promotes the formation of large lipid droplets in human adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013. 432(2): p. 296-301.
254. Sun, Z., et al., Perilipin1 promotes unilocular lipid droplet formation through the activation of Fsp27 in adipocytes. *Nat Commun*, 2013. 4: p. 1594.
255. Hallberg, M., et al., A functional interaction between RIP140 and PGC-1alpha regulates the expression of the lipid droplet protein CIDEA. *Mol Cell Biol*, 2008. 28(22): p. 6785-95.
256. Christianson, J.L., et al., Identification of the lipid droplet targeting domain of the Cidea protein. *J Lipid Res*, 2010. 51(12): p. 3455-62.
257. Zhou, L., et al., Cidea promotes hepatic steatosis by sensing dietary fatty acids. *Hepatology*, 2012. 56(1): p. 95-107.

258. Ye, J., et al., Cideb, an ER- and lipid droplet-associated protein, mediates VLDL lipidation and maturation by interacting with apolipoprotein B. *Cell Metab*, 2009. 9(2): p. 177-90.
259. Fei, W., et al., Fld1p, a functional homologue of human seipin, regulates the size of lipid droplets in yeast. *J Cell Biol*, 2008. 180(3): p. 473-82.
260. Andersson, L., et al., PLD1 and ERK2 regulate cytosolic lipid droplet formation. *J Cell Sci*, 2006. 119(Pt 11): p. 2246-57.
261. Marchesan, D., et al., A phospholipase D-dependent process forms lipid droplets containing caveolin, adipocyte differentiation-related protein, and vimentin in a cell-free system. *J Biol Chem*, 2003. 278(29): p. 27293-300.
262. Millership, S., et al., Increased lipolysis and altered lipid homeostasis protect gamma-synuclein-null mutant mice from diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. 109(51): p. 20943-8.
263. Kadereit, B., et al., Evolutionarily conserved gene family important for fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(1): p. 94-9.
264. Gross, D.A., C. Zhan, and D.L. Silver, Direct binding of triglyceride to fat storage-inducing transmembrane proteins 1 and 2 is important for lipid droplet formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. 108(49): p. 19581-6.
265. Klemm, R.W., et al., A conserved role for atlastin GTPases in regulating lipid droplet size. *Cell Rep*, 2013. 3(5): p. 1465-75.
266. Gubern, A., et al., Lipid droplet biogenesis induced by stress involves triacylglycerol synthesis that depends on group VIA phospholipase A2. *J Biol Chem*, 2009. 284(9): p. 5697-708.
267. Shibata, M., et al., LC3, a microtubule-associated protein1A/B light chain3, is involved in cytoplasmic lipid droplet formation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. 393(2): p. 274-9.
268. Baerga, R., et al., Targeted deletion of autophagy-related 5 (atg5) impairs adipogenesis in a cellular model and in mice. *Autophagy*, 2009. 5(8): p. 1118-30.
269. Whittaker, R., et al., Identification of MicroRNAs that control lipid droplet formation and growth in hepatocytes via high-content screening. *J Biomol Screen*, 2010. 15(7): p. 798-805.
270. Ji, J., et al., Over-expressed microRNA-27a and 27b influence fat accumulation and cell proliferation during rat hepatic stellate cell activation. *FEBS Lett*, 2009. 583(4): p. 759-66.
271. Singaravelu, R., et al., Hepatitis C virus induced up-regulation of microRNA-27: A novel mechanism for hepatic steatosis. *Hepatology*, 2013.
272. Listenberger, L.L., et al., Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(6): p. 3077-82.
273. Mei, S., et al., Differential roles of unsaturated and saturated fatty acids on autophagy and apoptosis in hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, 2011. 339(2): p. 487-98.
274. Kharroubi, I., et al., Free fatty acids and cytokines induce pancreatic beta-cell apoptosis by different mechanisms: role of nuclear factor-kappaB and endoplasmic reticulum stress. *Endocrinology*, 2004. 145(11): p. 5087-96.
275. Choi, S.E., et al., Stimulation of lipogenesis as well as fatty acid oxidation protects against palmitate-induced INS-1 beta-cell death. *Endocrinology*, 2011. 152(3): p. 816-27.
276. Cnop, M., et al., Inverse relationship between cytotoxicity of free fatty acids in pancreatic islet cells and cellular triglyceride accumulation. *Diabetes*, 2001. 50(8): p. 1771-7.
277. Baldwin, A.C., et al., A role for aberrant protein palmitoylation in FFA-induced ER stress and beta-cell death. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2012. 302(11): p. E1390-8.
278. Frigerio, F., et al., Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) protects against oleate-induced INS-1E beta cell dysfunction by preserving carbohydrate metabolism. *Diabetologia*, 2010. 53(2): p. 331-40.
279. Borradaile, N.M., et al., A critical role for eukaryotic elongation factor 1A-1 in lipotoxic cell death. *Mol Biol Cell*, 2006. 17(2): p. 770-8.
280. Borradaile, N.M., et al., Disruption of endoplasmic reticulum structure and integrity in lipotoxic cell death. *J Lipid Res*, 2006. 47(12): p. 2726-37.

281. Guo, W., et al., Palmitate modulates intracellular signaling, induces endoplasmic reticulum stress, and causes apoptosis in mouse 3T3-L1 and rat primary preadipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007. 293(2): p. E576-86.
282. Yuzefovych, L., G. Wilson, and L. Racheck, Different effects of oleate vs. palmitate on mitochondrial function, apoptosis, and insulin signaling in L6 skeletal muscle cells: role of oxidative stress. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010. 299(6): p. E1096-105.
283. Kakisaka, K., et al., A hedgehog survival pathway in 'undead' lipotoxic hepatocytes. *J Hepatol*, 2012. 57(4): p. 844-51.
284. Jun, D.W., et al., Prevention of free fatty acid-induced hepatic lipotoxicity by carnitine via reversal of mitochondrial dysfunction. *Liver Int*, 2011. 31(9): p. 1315-24.
285. Mantzaris, M.D., E.V. Tsianos, and D. Galaris, Interruption of triacylglycerol synthesis in the endoplasmic reticulum is the initiating event for saturated fatty acid-induced lipotoxicity in liver cells. *FEBS J*, 2011. 278(3): p. 519-30.
286. Wang, D., et al., Saturated Fatty Acid-induced cytotoxicity in liver cells does not involve phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10. *J Nutr Metab*, 2013. 2013: p. 514206.
287. Hapala, I., E. Marza, and T. Ferreira, Is fat so bad? Modulation of endoplasmic reticulum stress by lipid droplet formation. *Biol Cell*, 2011. 103(6): p. 271-85.
288. Maris, M., et al., Oleate-induced beta cell dysfunction and apoptosis: a proteomic approach to glucolipotoxicity by an unsaturated fatty acid. *J Proteome Res*, 2011. 10(8): p. 3372-85.
289. Hatanaka, E., et al., Oleic, linoleic and linolenic acids increase ros production by fibroblasts via NADPH oxidase activation. *PLoS One*, 2013. 8(4): p. e58626.
290. Zhu, Y., et al., Oleic acid causes apoptosis and dephosphorylates Bad. *Neurochem Int*, 2005. 46(2): p. 127-35.
291. Garbarino, J., et al., Sterol and diacylglycerol acyltransferase deficiency triggers fatty acid-mediated cell death. *J Biol Chem*, 2009. 284(45): p. 30994-1005.
292. Nguyen, L.N. and J.D. Nosanchuk, Lipid droplet formation protects against gluco/lipotoxicity in *Candida parapsilosis*: an essential role of fatty acid desaturase Ole1. *Cell Cycle*, 2011. 10(18): p. 3159-67.
293. Seifert, E.L., et al., Electron transport chain-dependent and -independent mechanisms of mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission during long-chain fatty acid oxidation. *J Biol Chem*, 2010. 285(8): p. 5748-58.
294. Summers, S.A., Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Prog Lipid Res*, 2006. 45(1): p. 42-72.
295. Las, G., et al., Fatty acids suppress autophagic turnover in beta-cells. *J Biol Chem*, 2011. 286(49): p. 42534-44.
296. Santos, L.R., et al., Oleic acid modulates metabolic substrate channeling during glucose-stimulated insulin secretion via NAD(P)H oxidase. *Endocrinology*, 2011. 152(10): p. 3614-21.
297. Cury-Boaventura, M.F. and R. Curi, Regulation of reactive oxygen species (ROS) production by C18 fatty acids in Jurkat and Raji cells. *Clin Sci (Lond)*, 2005. 108(3): p. 245-53.
298. Arany, I., et al., Role of p66shc in renal toxicity of oleic acid. *Am J Nephrol*, 2013. 38(3): p. 226-32.
299. Boren, J., et al., Ectopic lipid storage and insulin resistance: a harmful relationship. *J Intern Med*, 2013. 274(1): p. 25-40.
300. Henrique, C., et al., Increased mitochondrial fatty acid oxidation is sufficient to protect skeletal muscle cells from palmitate-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 2010. 285(47): p. 36818-27.
301. Robciuc, A., et al., Hyperosmolarity-induced lipid droplet formation depends on ceramide production by neutral sphingomyelinase 2. *J Lipid Res*, 2012. 53(11): p. 2286-95.
302. Fei, W., et al., Conditions of endoplasmic reticulum stress stimulate lipid droplet formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J*, 2009. 424(1): p. 61-7.
303. Lee, J.S., et al., Pharmacologic ER stress induces non-alcoholic steatohepatitis in an animal model. *Toxicol Lett*, 2012. 211(1): p. 29-38.
304. Holtta-Vuori, M., et al., Alleviation of seipinopathy-related ER stress by triglyceride storage. *Hum Mol Genet*,

2013. 22(6): p. 1157-66.
305. Lei, X., et al., Spontaneous development of endoplasmic reticulum stress that can lead to diabetes mellitus is associated with higher calcium-independent phospholipase A2 expression: a role for regulation by SREBP-1. *J Biol Chem*, 2010. 285(9): p. 6693-705.
306. Yamamoto, K., et al., Induction of liver steatosis and lipid droplet formation in ATF6alpha-knockout mice burdened with pharmacological endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell*, 2010. 21(17): p. 2975-86.
307. Lee, J.S., et al., Pharmacological ER stress promotes hepatic lipogenesis and lipid droplet formation. *Am J Transl Res*, 2012. 4(1): p. 102-13.
308. Deng, J., et al., Lipolysis response to endoplasmic reticulum stress in adipose cells. *J Biol Chem*, 2012. 287(9): p. 6240-9.
309. Boren, J. and K.M. Brindle, Apoptosis-induced mitochondrial dysfunction causes cytoplasmic lipid droplet formation. *Cell Death Differ*, 2012. 19(9): p. 1561-70.
310. Kotarsky, H., et al., Metabolite profiles reveal energy failure and impaired beta-oxidation in liver of mice with complex III deficiency due to a BCS1L mutation. *PLoS One*, 2012. 7(7): p. e41156.
311. Delikatny, E.J., et al., Nuclear magnetic resonance-visible lipids induced by cationic lipophilic chemotherapeutic agents are accompanied by increased lipid droplet formation and damaged mitochondria. *Cancer Res*, 2002. 62(5): p. 1394-400.
312. Zirath, H., et al., MYC inhibition induces metabolic changes leading to accumulation of lipid droplets in tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. 110(25): p. 10258-63.
313. Vankoningsloo, S., et al., Mitochondrial dysfunction induces triglyceride accumulation in 3T3-L1 cells: role of fatty acid beta-oxidation and glucose. *J Lipid Res*, 2005. 46(6): p. 1133-49.
314. He, Q., et al., Rotenone induces reductive stress and triacylglycerol deposition in C2C12 cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013.
315. Stephens, N.A., et al., Intramyocellular lipid droplets increase with progression of cachexia in cancer patients. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2011. 2(2): p. 111-117.
316. Julienne, C.M., et al., Cancer cachexia is associated with a decrease in skeletal muscle mitochondrial oxidative capacities without alteration of ATP production efficiency. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2012. 3(4): p. 265-75.
317. Zaugg, K., et al., Carnitine palmitoyltransferase 1C promotes cell survival and tumor growth under conditions of metabolic stress. *Genes Dev*, 2011. 25(10): p. 1041-51.
318. Hernandez-Gea, V., et al., Autophagy releases lipid that promotes fibrogenesis by activated hepatic stellate cells in mice and in human tissues. *Gastroenterology*, 2012. 142(4): p. 938-46.
319. Dobbins, R.L., et al., Prolonged inhibition of muscle carnitine palmitoyltransferase-1 promotes intramyocellular lipid accumulation and insulin resistance in rats. *Diabetes*, 2001. 50(1): p. 123-30.
320. Coen, P.M. and B.H. Goodpaster, Role of intramyocellular lipids in human health. *Trends Endocrinol Metab*, 2012. 23(8): p. 391-8.
321. Bostrom, P., et al., Hypoxia converts human macrophages into triglyceride-loaded foam cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. 26(8): p. 1871-6.
322. Gimm, T., et al., Hypoxia-inducible protein 2 is a novel lipid droplet protein and a specific target gene of hypoxia-inducible factor-1. *FASEB J*, 2010. 24(11): p. 4443-58.
323. Mylonis, I., et al., Hypoxia causes triglyceride accumulation by HIF-1-mediated stimulation of lipin 1 expression. *J Cell Sci*, 2012. 125(Pt 14): p. 3485-93.
324. Daniel, J., et al., Mycobacterium tuberculosis uses host triacylglycerol to accumulate lipid droplets and acquires a dormancy-like phenotype in lipid-loaded macrophages. *PLoS Pathog*, 2011. 7(6): p. e1002093.
325. Li, L., et al., The importance of GLUT3 for de novo lipogenesis in hypoxia-induced lipid loading of human macrophages. *PLoS One*, 2012. 7(8): p. e42360.
326. Jiang, L., et al., Localized hypoxia results in spatially heterogeneous metabolic signatures in breast tumor models. *Neoplasia*, 2012. 14(8): p. 732-41.

327. Hakumaki, J.M., et al., 1H MRS detects polyunsaturated fatty acid accumulation during gene therapy of glioma: implications for the in vivo detection of apoptosis. *Nat Med*, 1999. 5(11): p. 1323-7.
328. Al-Saffar, N.M., et al., Apoptosis is associated with triacylglycerol accumulation in Jurkat T-cells. *Br J Cancer*, 2002. 86(6): p. 963-70.
329. Mukundan, L., et al., PPAR-delta senses and orchestrates clearance of apoptotic cells to promote tolerance. *Nat Med*, 2009. 15(11): p. 1266-72.
330. Melo, R.C. and A.M. Dvorak, Lipid body-phagosome interaction in macrophages during infectious diseases: host defense or pathogen survival strategy? *PLoS Pathog*, 2012. 8(7): p. e1002729.
331. Harris, C., et al., Hepatitis C virus core protein decreases lipid droplet turnover: a mechanism for core-induced steatosis. *J Biol Chem*, 2011. 286(49): p. 42615-25.
332. Boulant, S., et al., Hepatitis C virus core protein induces lipid droplet redistribution in a microtubule- and dynein-dependent manner. *Traffic*, 2008. 9(8): p. 1268-82.
333. Miyanari, Y., et al., The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol*, 2007. 9(9): p. 1089-97.
334. Ploen, D., et al., TIP47 plays a crucial role in the life cycle of hepatitis C virus. *J Hepatol*, 2013. 58(6): p. 1081-8.
335. Samsa, M.M., et al., Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. *PLoS Pathog*, 2009. 5(10): p. e1000632.
336. Cheung, W., et al., Rotaviruses associate with cellular lipid droplet components to replicate in viroplasm, and compounds disrupting or blocking lipid droplets inhibit viroplasm formation and viral replication. *J Virol*, 2010. 84(13): p. 6782-98.
337. Gaunt, E.R., et al., Lipidome analysis of rotavirus-infected cells confirms the close interaction of lipid droplets with viroplasm. *J Gen Virol*, 2013. 94(Pt 7): p. 1576-86.
338. Helbig, K.J., et al., The antiviral protein viperin inhibits hepatitis C virus replication via interaction with non-structural protein 5A. *Hepatology*, 2011. 54(5): p. 1506-17.
339. Nose, F., et al., Crucial role of perilipin-3 (TIP47) in formation of lipid droplets and PGE2 production in HL-60-derived neutrophils. *PLoS One*, 2013. 8(8): p. e71542.
340. Wang, J., et al., Lipopolysaccharide promotes lipid accumulation in human adventitial fibroblasts via TLR4-NF-kappaB pathway. *Lipids Health Dis*, 2012. 11: p. 139.
341. Khatchadourian, A., et al., Dynamics and regulation of lipid droplet formation in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated microglia. *Biochim Biophys Acta*, 2012. 1821(4): p. 607-17.
342. Almeida, P.E., et al., PPARgamma Expression and Function in Mycobacterial Infection: Roles in Lipid Metabolism, Immunity, and Bacterial Killing. *PPAR Res*, 2012. 2012: p. 383829.
343. Stehr, M., A.A. Elamin, and M. Singh, Cytosolic lipid inclusions formed during infection by viral and bacterial pathogens. *Microbes Infect*, 2012. 14(13): p. 1227-37.
344. Anand, P., et al., A novel role for lipid droplets in the organismal antibacterial response. *Elife*, 2012. 1: p. e00003.
345. D'Avila, H., et al., Host cell lipid bodies triggered by *Trypanosoma cruzi* infection and enhanced by the uptake of apoptotic cells are associated with prostaglandin E(2) generation and increased parasite growth. *J Infect Dis*, 2011. 204(6): p. 951-61.
346. Lecoecur, H., et al., Reprogramming neutral lipid metabolism in mouse dendritic leucocytes hosting live *Leishmania amazonensis* amastigotes. *PLoS Negl Trop Dis*, 2013. 7(6): p. e2276.
347. Savage, M.J., D.J. Goldberg, and S. Schacher, Absolute specificity for retrograde fast axonal transport displayed by lipid droplets originating in the axon of an identified *Aplysia* neuron in vitro. *Brain Res*, 1987. 406(1-2): p. 215-23.
348. Martin, S., et al., Regulated localization of Rab18 to lipid droplets: effects of lipolytic stimulation and inhibition of lipid droplet catabolism. *J Biol Chem*, 2005. 280(51): p. 42325-35.
349. Welte, M.A., Fat on the move: intracellular motion of lipid droplets. *Biochem Soc Trans*, 2009. 37(Pt 5): p. 991-6.
350. Jungst, C., M.J. Winterhalder, and A. Zumbusch, Fast and long term lipid droplet tracking with CARS micros-



- copy. *J Biophotonics*, 2011. 4(6): p. 435-41.
351. Targett-Adams, P., et al., Live cell analysis and targeting of the lipid droplet-binding adipocyte differentiation-related protein. *J Biol Chem*, 2003. 278(18): p. 15998-6007.
  352. Nan, X., E.O. Potma, and X.S. Xie, Nonperturbative chemical imaging of organelle transport in living cells with coherent anti-stokes Raman scattering microscopy. *Biophys J*, 2006. 91(2): p. 728-35.
  353. Valetti, C., et al., Role of dynactin in endocytic traffic: effects of dynamitin overexpression and colocalization with CLIP-170. *Mol Biol Cell*, 1999. 10(12): p. 4107-20.
  354. Spandl, J., et al., Live cell multicolor imaging of lipid droplets with a new dye, LD540. *Traffic*, 2009. 10(11): p. 1579-84.
  355. Lyn, R.K., et al., Dynamics of lipid droplets induced by the hepatitis C virus core protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. 399(4): p. 518-24.
  356. Welte, M.A., et al., Developmental regulation of vesicle transport in *Drosophila* embryos: forces and kinetics. *Cell*, 1998. 92(4): p. 547-57.
  357. Gaspar, I. and J. Szabad, Glu415 in the alpha-tubulins plays a key role in stabilizing the microtubule-ADP-kinesin complexes. *J Cell Sci*, 2009. 122(Pt 16): p. 2857-65.
  358. Gross, S.P., et al., Dynein-mediated cargo transport in vivo. A switch controls travel distance. *J Cell Biol*, 2000. 148(5): p. 945-56.
  359. Bostrom, P., et al., Cytosolic lipid droplets increase in size by microtubule-dependent complex formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. 25(9): p. 1945-51.
  360. Orlicky, D.J., et al., Dynamics and molecular determinants of cytoplasmic lipid droplet clustering and dispersion. *PLoS One*, 2013. 8(6): p. e66837.
  361. Shubeita, G.T., et al., Consequences of motor copy number on the intracellular transport of kinesin-1-driven lipid droplets. *Cell*, 2008. 135(6): p. 1098-107.
  362. Kunwar, A., et al., Mechanical stochastic tug-of-war models cannot explain bidirectional lipid-droplet transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. 108(47): p. 18960-5.
  363. Weibel, G.L., et al., Cytoskeleton disruption in J774 macrophages: consequences for lipid droplet formation and cholesterol flux. *Biochim Biophys Acta*, 2012. 1821(3): p. 464-72.
  364. Watanabe, T., et al., Characterisation of the dynamic behaviour of lipid droplets in the early mouse embryo using adaptive harmonic generation microscopy. *BMC Cell Biol*, 2010. 11: p. 38.
  365. Gross, S.P., et al., A determinant for directionality of organelle transport in *Drosophila* embryos. *Curr Biol*, 2003. 13(19): p. 1660-8.
  366. Yu, Y.V., et al., Targeting the motor regulator Klar to lipid droplets. *BMC Cell Biol*, 2011. 12: p. 9.
  367. Welte, M.A., et al., Regulation of lipid-droplet transport by the perilipin homolog LSD2. *Curr Biol*, 2005. 15(14): p. 1266-75.
  368. Larsen, K.S., et al., BicaudalD actively regulates microtubule motor activity in lipid droplet transport. *PLoS One*, 2008. 3(11): p. e3763.
  369. Gronke, S., et al., Control of fat storage by a *Drosophila* PAT domain protein. *Curr Biol*, 2003. 13(7): p. 603-6.
  370. Orlicky, D.J., et al., Chronic ethanol consumption in mice alters hepatocyte lipid droplet properties. *Alcohol Clin Exp Res*, 2011. 35(6): p. 1020-33.
  371. Jambunathan, S., et al., FSP27 promotes lipid droplet clustering and then fusion to regulate triglyceride accumulation. *PLoS One*, 2011. 6(12): p. e28614.
  372. Marcinkiewicz, A., et al., The phosphorylation of serine 492 of perilipin directs lipid droplet fragmentation and dispersion. *J Biol Chem*, 2006. 281(17): p. 11901-9.
  373. Beller, M., et al., Lipid droplets: a dynamic organelle moves into focus. *FEBS Lett*, 2010. 584(11): p. 2176-82.
  374. Jacquier, N., et al., Lipid droplets are functionally connected to the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci*, 2011. 124(Pt 14): p. 2424-37.
  375. Wolinski, H., et al., A role for seipin in lipid droplet dynamics and inheritance in yeast. *J Cell Sci*, 2011. 124(Pt 22): p. 3894-904.



376. Szymanski, K.M., et al., The lipodystrophy protein seipin is found at endoplasmic reticulum lipid droplet junctions and is important for droplet morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(52): p. 20890-5.
377. Binns, D., et al., Seipin is a discrete homooligomer. *Biochemistry*, 2010. 49(50): p. 10747-55.
378. Fei, W., et al., Molecular characterization of seipin and its mutants: implications for seipin in triacylglycerol synthesis. *J Lipid Res*, 2011. 52(12): p. 2136-47.
379. Xu, N., et al., The FATP1-DGAT2 complex facilitates lipid droplet expansion at the ER-lipid droplet interface. *J Cell Biol*, 2012. 198(5): p. 895-911.
380. Ozeki, S., et al., Rab18 localizes to lipid droplets and induces their close apposition to the endoplasmic reticulum-derived membrane. *J Cell Sci*, 2005. 118(Pt 12): p. 2601-11.
381. Pulido, M.R., et al., Rab18 dynamics in adipocytes in relation to lipogenesis, lipolysis and obesity. *PLoS One*, 2011. 6(7): p. e22931.
382. Liu, P., et al., Rab-regulated interaction of early endosomes with lipid droplets. *Biochim Biophys Acta*, 2007. 1773(6): p. 784-93.
383. Blanchette-Mackie, E.J. and R.O. Scow, Movement of lipolytic products to mitochondria in brown adipose tissue of young rats: an electron microscope study. *J Lipid Res*, 1983. 24(3): p. 229-44.
384. Perktold, A., et al., Organelle association visualized by three-dimensional ultrastructural imaging of the yeast cell. *FEMS Yeast Res*, 2007. 7(4): p. 629-38.
385. Dinis, A.M. and A.P. Coutinho, Interaction of lipid bodies with other cell organelles in the maturing pollen of *Magnolia x soulangeana* (Magnoliaceae). *Protoplasma*, 2009. 238(1-4): p. 35-46.
386. Hall, P.F. and G. Almahbobi, Roles of microfilaments and intermediate filaments in adrenal steroidogenesis. *Microsc Res Tech*, 1997. 36(6): p. 463-79.
387. Sturme, R.G., P.J. O'Toole, and H.J. Leese, Fluorescence resonance energy transfer analysis of mitochondrial:lipid association in the porcine oocyte. *Reproduction*, 2006. 132(6): p. 829-37.
388. Mochizuki, I., K. Kubo, and T. Honda, Relationship between mitochondria and the development of specific lipid droplets in capillary endothelial cells of the respiratory tract in patients with sarcoidosis. *Mitochondrion*, 2011. 11(4): p. 601-6.
389. Shen, W.J., et al., Ablation of vimentin results in defective steroidogenesis. *Endocrinology*, 2012. 153(7): p. 3249-57.
390. Weber, J.M., et al., Design of the oxygen and substrate pathways. III. Partitioning energy provision from carbohydrates. *J Exp Biol*, 1996. 199(Pt 8): p. 1659-66.
391. Lally, J.S., et al., Subcellular lipid droplet distribution in red and white muscles in the obese Zucker rat. *Diabetologia*, 2012. 55(2): p. 479-88.
392. Bosma, M., et al., The lipid droplet coat protein perilipin 5 also localizes to muscle mitochondria. *Histochem Cell Biol*, 2012. 137(2): p. 205-16.
393. Pu, J., et al., Interatomic study on interaction between lipid droplets and mitochondria. *Protein Cell*, 2011. 2(6): p. 487-96.
394. Jagerstrom, S., et al., Lipid droplets interact with mitochondria using SNAP23. *Cell Biol Int*, 2009. 33(9): p. 934-40.
395. Shaw, C.S., D.A. Jones, and A.J. Wagenmakers, Network distribution of mitochondria and lipid droplets in human muscle fibres. *Histochem Cell Biol*, 2008. 129(1): p. 65-72.
396. Wang, H., et al., Perilipin 5, a lipid droplet-associated protein, provides physical and metabolic linkage to mitochondria. *J Lipid Res*, 2011. 52(12): p. 2159-68.
397. Tarnopolsky, M.A., et al., 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*, 2007. 292(3): p. R1271-8.
398. Kanaley, J.A., et al., Relationship between plasma free fatty acid, intramyocellular triglycerides and long-chain acylcarnitines in resting humans. *J Physiol*, 2009. 587(Pt 24): p. 5939-50.
399. Crane, J.D., et al., The effect of aging on human skeletal muscle mitochondrial and intramyocellular lipid ultrastructure. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2010. 65(2): p. 119-28.

400. Shiozaki, M., et al., Closer association of mitochondria with lipid droplets in hepatocytes and activation of Kupffer cells in resveratrol-treated senescence-accelerated mice. *Histochem Cell Biol*, 2011. 136(4): p. 475-89.
401. Wolins, N.E., et al., OXPAT/PAT-1 is a PPAR-induced lipid droplet protein that promotes fatty acid utilization. *Diabetes*, 2006. 55(12): p. 3418-28.
402. Li, H., et al., LSDP5 enhances triglyceride storage in hepatocytes by influencing lipolysis and fatty acid beta-oxidation of lipid droplets. *PLoS One*, 2012. 7(6): p. e36712.
403. Granneman, J.G., et al., Interactions of perilipin-5 (Plin5) with adipose triglyceride lipase. *J Biol Chem*, 2011. 286(7): p. 5126-35.
404. Wang, H., et al., Unique regulation of adipose triglyceride lipase (ATGL) by perilipin 5, a lipid droplet-associated protein. *J Biol Chem*, 2011. 286(18): p. 15707-15.
405. Amati, F., et al., Skeletal muscle triglycerides, diacylglycerols, and ceramides in insulin resistance: another paradox in endurance-trained athletes? *Diabetes*, 2011. 60(10): p. 2588-97.
406. Pidoux, G., et al., Optic atrophy 1 is an A-kinase anchoring protein on lipid droplets that mediates adrenergic control of lipolysis. *EMBO J*, 2011. 30(21): p. 4371-86.
407. Binns, D., et al., An intimate collaboration between peroxisomes and lipid bodies. *J Cell Biol*, 2006. 173(5): p. 719-31.
408. Schrader, M., Tubulo-reticular clusters of peroxisomes in living COS-7 cells: dynamic behavior and association with lipid droplets. *J Histochem Cytochem*, 2001. 49(11): p. 1421-29.
409. Blanchette-Mackie, E.J., et al., Perilipin is located on the surface layer of intracellular lipid droplets in adipocytes. *J Lipid Res*, 1995. 36(6): p. 1211-26.
410. Singh, R., et al., Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*, 2009. 458(7242): p. 1131-5.
411. van Manen, H.J., et al., Single-cell Raman and fluorescence microscopy reveal the association of lipid bodies with phagosomes in leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(29): p. 10159-64.
412. Nelson, D.L. and M.M. Cox, *Lehninger Principios de Bioquímica*. Tercera Edición. third ed2001: Ediciones Omega.
413. Zimmermann, R., et al., Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science*, 2004. 306(5700): p. 1383-6.
414. Jenkins, C.M., et al., Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. *J Biol Chem*, 2004. 279(47): p. 48968-75.
415. Lass, A., et al., Lipolysis - a highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. *Prog Lipid Res*, 2011. 50(1): p. 14-27.
416. Smirnova, E., et al., ATGL has a key role in lipid droplet/adiposome degradation in mammalian cells. *EMBO Rep*, 2006. 7(1): p. 106-13.
417. Lass, A., et al., Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell Metab*, 2006. 3(5): p. 309-19.
418. Gruber, A., et al., The N-terminal region of comparative gene identification-58 (CGI-58) is important for lipid droplet binding and activation of adipose triglyceride lipase. *J Biol Chem*, 2010. 285(16): p. 12289-98.
419. Schweiger, M., et al., The C-terminal region of human adipose triglyceride lipase affects enzyme activity and lipid droplet binding. *J Biol Chem*, 2008. 283(25): p. 17211-20.
420. Yamaguchi, T., et al., CGI-58 facilitates lipolysis on lipid droplets but is not involved in the vesiculation of lipid droplets caused by hormonal stimulation. *J Lipid Res*, 2007. 48(5): p. 1078-89.
421. Olzmann, J.A., C.M. Richter, and R.R. Kopito, Spatial regulation of UBXD8 and p97/VCP controls ATGL-mediated lipid droplet turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. 110(4): p. 1345-50.
422. Lu, X., X. Yang, and J. Liu, Differential control of ATGL-mediated lipid droplet degradation by CGI-58 and G0S2. *Cell Cycle*, 2010. 9(14): p. 2719-25.
423. Schweiger, M., et al., G0/G1 switch gene-2 regulates human adipocyte lipolysis by affecting activity and localization of adipose triglyceride lipase. *J Lipid Res*, 2012. 53(11): p. 2307-17.

424. Wang, Y., et al., The g0/g1 switch gene 2 is an important regulator of hepatic triglyceride metabolism. *PLoS One*, 2013. 8(8): p. e72315.
425. Narbonne, P. and R. Roy, *Caenorhabditis elegans* dauers need LKB1/AMPK to ration lipid reserves and ensure long-term survival. *Nature*, 2009. 457(7226): p. 210-4.
426. Ahmadian, M., et al., Desnutrin/ATGL is regulated by AMPK and is required for a brown adipose phenotype. *Cell Metab*, 2011. 13(6): p. 739-48.
427. Haemmerle, G., et al., Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis. *J Biol Chem*, 2002. 277(7): p. 4806-15.
428. Morimoto, C., et al., Relationships between lipolysis induced by various lipolytic agents and hormone-sensitive lipase in rat fat cells. *J Lipid Res*, 2001. 42(1): p. 120-7.
429. Shen, W.J., et al., Characterization of the functional interaction of adipocyte lipid-binding protein with hormone-sensitive lipase. *J Biol Chem*, 2001. 276(52): p. 49443-8.
430. Quiroga, A.D. and R. Lehner, Liver triacylglycerol lipases. *Biochim Biophys Acta*, 2012. 1821(5): p. 762-9.
431. Lake, A.C., et al., Expression, regulation, and triglyceride hydrolase activity of Adiponutrin family members. *J Lipid Res*, 2005. 46(11): p. 2477-87.
432. Zechner, R., et al., FAT SIGNALS--lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. *Cell Metab*, 2012. 15(3): p. 279-91.
433. MacPherson, R.E., et al., Skeletal muscle PLIN proteins, ATGL and CGI-58, interactions at rest and following stimulated contraction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2013. 304(8): p. R644-50.
434. Schweiger, M., et al., Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism. *J Biol Chem*, 2006. 281(52): p. 40236-41.
435. Subramanian, V., et al., Perilipin A mediates the reversible binding of CGI-58 to lipid droplets in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, 2004. 279(40): p. 42062-71.
436. Gandotra, S., et al., Human frame shift mutations affecting the carboxyl terminus of perilipin increase lipolysis by failing to sequester the adipose triglyceride lipase (ATGL) coactivator AB-hydrolase-containing 5 (ABHD5). *J Biol Chem*, 2011. 286(40): p. 34998-5006.
437. Sztalryd, C., et al., Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation. *J Cell Biol*, 2003. 161(6): p. 1093-103.
438. Miyoshi, H., et al., Adipose triglyceride lipase regulates basal lipolysis and lipid droplet size in adipocytes. *J Cell Biochem*, 2008. 105(6): p. 1430-6.
439. Greenberg, A.S., et al., Stimulation of lipolysis and hormone-sensitive lipase via the extracellular signal-regulated kinase pathway. *J Biol Chem*, 2001. 276(48): p. 45456-61.
440. Donsmark, M., et al., Contractions activate hormone-sensitive lipase in rat muscle by protein kinase C and mitogen-activated protein kinase. *J Physiol*, 2003. 550(Pt 3): p. 845-54.
441. Shen, W.J., et al., Vimentin is a functional partner of hormone sensitive lipase and facilitates lipolysis. *J Proteome Res*, 2010. 9(4): p. 1786-94.
442. Kumar, N., et al., Requirement of vimentin filament assembly for beta3-adrenergic receptor activation of ERK MAP kinase and lipolysis. *J Biol Chem*, 2007. 282(12): p. 9244-50.
443. Miyoshi, H., et al., Control of adipose triglyceride lipase action by serine 517 of perilipin A globally regulates protein kinase A-stimulated lipolysis in adipocytes. *J Biol Chem*, 2007. 282(2): p. 996-1002.
444. Shen, W.J., et al., Functional interaction of hormone-sensitive lipase and perilipin in lipolysis. *J Lipid Res*, 2009. 50(11): p. 2306-13.
445. Miyoshi, H., et al., Perilipin promotes hormone-sensitive lipase-mediated adipocyte lipolysis via phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem*, 2006. 281(23): p. 15837-44.
446. Granneman, J.G., et al., Perilipin controls lipolysis by regulating the interactions of AB-hydrolase containing 5 (Abhd5) and adipose triglyceride lipase (Atgl). *J Biol Chem*, 2009. 284(50): p. 34538-44.
447. Ho, P.C., et al., Cytoplasmic receptor-interacting protein 140 (RIP140) interacts with perilipin to regulate lipolysis. *Cell Signal*, 2011. 23(8): p. 1396-403.
448. Bridges, D., et al., Identification and characterization of D-AKAP1 as a major adipocyte PKA and PP1 binding

- protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. 346(1): p. 351-7.
449. Bezaire, V., et al., Contribution of adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase to lipolysis in hMADS adipocytes. *J Biol Chem*, 2009. 284(27): p. 18282-91.
450. Moore, H.P., et al., Perilipin targets a novel pool of lipid droplets for lipolytic attack by hormone-sensitive lipase. *J Biol Chem*, 2005. 280(52): p. 43109-20.
451. Hashimoto, T., et al., Active involvement of micro-lipid droplets and lipid-droplet-associated proteins in hormone-stimulated lipolysis in adipocytes. *J Cell Sci*, 2012. 125(Pt 24): p. 6127-36.
452. Wend, K., et al., ERalpha regulates lipid metabolism in bone through ATGL and perilipin. *J Cell Biochem*, 2013. 114(6): p. 1306-14.
453. Ranjit, S., et al., Regulation of fat specific protein 27 by isoproterenol and TNF-alpha to control lipolysis in murine adipocytes. *J Lipid Res*, 2011. 52(2): p. 221-36.
454. Kitamura, T., et al., Insulin-induced phosphorylation and activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B by the serine-threonine kinase Akt. *Mol Cell Biol*, 1999. 19(9): p. 6286-96.
455. Choi, S.M., et al., Insulin regulates adipocyte lipolysis via an Akt-independent signaling pathway. *Mol Cell Biol*, 2010. 30(21): p. 5009-20.
456. Wang, H. and C. Sztalryd, Oxidative tissue: perilipin 5 links storage with the furnace. *Trends Endocrinol Metab*, 2011. 22(6): p. 197-203.
457. Alsted, T.J., et al., Contraction-induced lipolysis is not impaired by inhibition of hormone-sensitive lipase in skeletal muscle. *J Physiol*, 2013. 591(Pt 20): p. 5141-55.
458. Kuramoto, K., et al., Perilipin 5, a lipid droplet-binding protein, protects heart from oxidative burden by sequestering fatty acid from excessive oxidation. *J Biol Chem*, 2012. 287(28): p. 23852-63.
459. Pollak, N.M., et al., Cardiac-specific overexpression of perilipin 5 provokes severe cardiac steatosis via the formation of a lipolytic barrier. *J Lipid Res*, 2013. 54(4): p. 1092-102.
460. Bosma, M., et al., Overexpression of PLIN5 in skeletal muscle promotes oxidative gene expression and intramyocellular lipid content without compromising insulin sensitivity. *Biochim Biophys Acta*, 2013. 1831(4): p. 844-52.
461. Kienesberger, P.C., et al., Myocardial triacylglycerol metabolism. *J Mol Cell Cardiol*, 2013. 55: p. 101-10.
462. Watt, M.J., et al., Beta-adrenergic stimulation of skeletal muscle HSL can be overridden by AMPK signaling. *FASEB J*, 2004. 18(12): p. 1445-6.
463. Granneman, J.G., et al., Functional interactions between Mldp (LSDP5) and Abhd5 in the control of intracellular lipid accumulation. *J Biol Chem*, 2009. 284(5): p. 3049-57.
464. Wu, J.W., et al., Deficiency of liver adipose triglyceride lipase in mice causes progressive hepatic steatosis. *Hepatology*, 2011. 54(1): p. 122-32.
465. Wei, E., et al., Loss of TGH/Ces3 in mice decreases blood lipids, improves glucose tolerance, and increases energy expenditure. *Cell Metab*, 2010. 11(3): p. 183-93.
466. Lian, J., et al., Liver specific inactivation of carboxylesterase 3/triacylglycerol hydrolase decreases blood lipids without causing severe steatosis in mice. *Hepatology*, 2012. 56(6): p. 2154-62.
467. Girusse, A. and D. Langin, Adipocyte lipases and lipid droplet-associated proteins: insight from transgenic mouse models. *Int J Obes (Lond)*, 2012. 36(4): p. 581-94.
468. Quiroga, A.D. and R. Lehner, Role of endoplasmic reticulum neutral lipid hydrolases. *Trends Endocrinol Metab*, 2011. 22(6): p. 218-25.
469. Ouimet, M. and Y.L. Marcel, Regulation of lipid droplet cholesterol efflux from macrophage foam cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012. 32(3): p. 575-81.
470. Hamasaki, M., et al., Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature*, 2013. 495(7441): p. 389-93.
471. Shibata, M., et al., The MAP1-LC3 conjugation system is involved in lipid droplet formation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. 382(2): p. 419-23.
472. O'Rourke, E.J. and G. Ruvkun, MXL-3 and HLH-30 transcriptionally link lipolysis and autophagy to nutrient availability. *Nat Cell Biol*, 2013. 15(6): p. 668-76.

473. Eid, N., et al., Elevated autophagic sequestration of mitochondria and lipid droplets in steatotic hepatocytes of chronic ethanol-treated rats: an immunohistochemical and electron microscopic study. *J Mol Histol*, 2013. 44(3): p. 311-26.
474. Kim, H.S., et al., Epigallocatechin gallate (EGCG) stimulates autophagy in vascular endothelial cells: a potential role for reducing lipid accumulation. *J Biol Chem*, 2013. 288(31): p. 22693-705.
475. Robinet, P., B. Ritchey, and J.D. Smith, Physiological difference in autophagic flux in macrophages from 2 mouse strains regulates cholesterol ester metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013. 33(5): p. 903-10.
476. Quimet, M., et al., Autophagy regulates cholesterol efflux from macrophage foam cells via lysosomal acid lipase. *Cell Metab*, 2011. 13(6): p. 655-67.
477. Thoen, L.F., et al., A role for autophagy during hepatic stellate cell activation. *J Hepatol*, 2011. 55(6): p. 1353-60.
478. Kaushik, S., et al., Autophagy in hypothalamic AgRP neurons regulates food intake and energy balance. *Cell Metab*, 2011. 14(2): p. 173-83.
479. Kaini, R.R., et al., Autophagy regulates lipolysis and cell survival through lipid droplet degradation in androgen-sensitive prostate cancer cells. *Prostate*, 2012. 72(13): p. 1412-22.
480. Zhang, Y., et al., Adipose-specific deletion of autophagy-related gene 7 (*atg7*) in mice reveals a role in adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(47): p. 19860-5.
481. Gibbons, G.F., K. Islam, and R.J. Pease, Mobilisation of triacylglycerol stores. *Biochim Biophys Acta*, 2000. 1483(1): p. 37-57.
482. Somwar, R., C.T. Roberts, Jr., and O. Varlamov, Live-cell imaging demonstrates rapid cargo exchange between lipid droplets in adipocytes. *FEBS Lett*, 2011. 585(12): p. 1946-50.
483. Gauthier, M.S., et al., AMP-activated protein kinase is activated as a consequence of lipolysis in the adipocyte: potential mechanism and physiological relevance. *J Biol Chem*, 2008. 283(24): p. 16514-24.
484. Daval, M., et al., Anti-lipolytic action of AMP-activated protein kinase in rodent adipocytes. *J Biol Chem*, 2005. 280(26): p. 25250-7.
485. Koh, H.J., et al., Adrenaline is a critical mediator of acute exercise-induced AMP-activated protein kinase activation in adipocytes. *Biochem J*, 2007. 403(3): p. 473-81.
486. Djouder, N., et al., PKA phosphorylates and inactivates AMPKalpha to promote efficient lipolysis. *EMBO J*, 2010. 29(2): p. 469-81.
487. Bamedia, D., et al., Dynamic changes in lipid droplet-associated proteins in the "browning" of white adipose tissues. *Biochim Biophys Acta*, 2013. 1831(5): p. 924-33.
488. Reid, B.N., et al., Hepatic overexpression of hormone-sensitive lipase and adipose triglyceride lipase promotes fatty acid oxidation, stimulates direct release of free fatty acids, and ameliorates steatosis. *J Biol Chem*, 2008. 283(19): p. 13087-99.
489. Faleck, D.M., et al., Adipose differentiation-related protein regulates lipids and insulin in pancreatic islets. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010. 299(2): p. E249-57.
490. Chandak, P.G., et al., Efficient phagocytosis requires triacylglycerol hydrolysis by adipose triglyceride lipase. *J Biol Chem*, 2010. 285(26): p. 20192-201.
491. Igal, R.A. and R.A. Coleman, Acylglycerol recycling from triacylglycerol to phospholipid, not lipase activity, is defective in neutral lipid storage disease fibroblasts. *J Biol Chem*, 1996. 271(28): p. 16644-51.
492. Kurat, C.F., et al., Cdk1/Cdc28-dependent activation of the major triacylglycerol lipase Tgl4 in yeast links lipolysis to cell-cycle progression. *Mol Cell*, 2009. 33(1): p. 53-63.
493. Konige, M., H. Wang, and C. Sztalryd, Role of adipose specific lipid droplet proteins in maintaining whole body energy homeostasis. *Biochim Biophys Acta*, 2013.
494. Schulz, T.J. and Y.H. Tseng, Brown adipose tissue: development, metabolism and beyond. *Biochem J*, 2013. 453(2): p. 167-78.
495. Mottillo, E.P., et al., Lipolytic products activate peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and delta in brown adipocytes to match fatty acid oxidation with supply. *J Biol Chem*, 2012. 287(30): p. 25038-

- 48.
496. Dalen, K.T., et al., PPARalpha activators and fasting induce the expression of adipose differentiation-related protein in liver. *J Lipid Res*, 2006. 47(5): p. 931-43.
497. Nguyen, P., et al., Liver lipid metabolism. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, 2008. 92(3): p. 272-83.
498. Garcia-Arcos, I., et al., Lipid analysis reveals quiescent and regenerating liver-specific populations of lipid droplets. *Lipids*, 2010. 45(12): p. 1101-8.
499. Sydor, S., et al., Steatosis does not impair liver regeneration after partial hepatectomy. *Lab Invest*, 2013. 93(1): p. 20-30.
500. Fu, D., et al., Coordinated elevation of mitochondrial oxidative phosphorylation and autophagy help drive hepatocyte polarization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. 110(18): p. 7288-93.
501. D'Ambrosio, D.N., et al., Distinct populations of hepatic stellate cells in the mouse liver have different capacities for retinoid and lipid storage. *PLoS One*, 2011. 6(9): p. e24993.
502. Blaner, W.S., et al., Hepatic stellate cell lipid droplets: a specialized lipid droplet for retinoid storage. *Biochim Biophys Acta*, 2009. 1791(6): p. 467-73.
503. Lee, T.F., et al., Downregulation of hepatic stellate cell activation by retinol and palmitate mediated by adipose differentiation-related protein (ADRP). *J Cell Physiol*, 2010. 223(3): p. 648-57.
504. Demignot, S., F. Beilstein, and E. Morel, Triglyceride-rich lipoproteins and cytosolic lipid droplets in enterocytes: Key players in intestinal physiology and metabolic disorders. *Biochimie*, 2013.
505. Borg, J., et al., Perilipin is present in islets of Langerhans and protects against lipotoxicity when overexpressed in the beta-cell line INS-1. *Endocrinology*, 2009. 150(7): p. 3049-57.
506. Nadeau, K.J., et al., Exercise training and calorie restriction increase SREBP-1 expression and intramuscular triglyceride in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006. 291(1): p. E90-8.
507. Haemmerle, G., et al., ATGL-mediated fat catabolism regulates cardiac mitochondrial function via PPAR-alpha and PGC-1. *Nat Med*, 2011. 17(9): p. 1076-85.
508. Saddik, M. and G.D. Lopaschuk, Myocardial triglyceride turnover during reperfusion of isolated rat hearts subjected to a transient period of global ischemia. *J Biol Chem*, 1992. 267(6): p. 3825-31.
509. Torday, J., J. Hua, and R. Slavin, Metabolism and fate of neutral lipids of fetal lung fibroblast origin. *Biochim Biophys Acta*, 1995. 1254(2): p. 198-206.
510. Schultz, C.J., et al., Role of adipocyte differentiation-related protein in surfactant phospholipid synthesis by type II cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002. 283(2): p. L288-96.
511. Murphy, G., Jr., et al., Combustion-derived hydrocarbons localize to lipid droplets in respiratory cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2008. 38(5): p. 532-40.
512. Rowan-Carroll, A., et al., Mice exposed in situ to urban air pollution exhibit pulmonary alterations in gene expression in the lipid droplet synthesis pathways. *Environ Mol Mutagen*, 2013. 54(4): p. 240-9.
513. Bozza, P.T., K.G. Magalhaes, and P.F. Weller, Leukocyte lipid bodies - Biogenesis and functions in inflammation. *Biochim Biophys Acta*, 2009. 1791(6): p. 540-51.
514. Bozza, P.T., et al., Lipid body function in eicosanoid synthesis: an update. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2011. 85(5): p. 205-13.
515. Dove, D.E., et al., ACAT1 deficiency increases cholesterol synthesis in mouse peritoneal macrophages. *Atherosclerosis*, 2006. 186(2): p. 267-74.
516. Dove, D.E., et al., ACAT1 deficiency disrupts cholesterol efflux and alters cellular morphology in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. 25(1): p. 128-34.
517. Bougneres, L., et al., A role for lipid bodies in the cross-presentation of phagocytosed antigens by MHC class I in dendritic cells. *Immunity*, 2009. 31(2): p. 232-44.
518. Saitoh, T., et al., Antiviral protein Viperin promotes Toll-like receptor 7- and Toll-like receptor 9-mediated type I interferon production in plasmacytoid dendritic cells. *Immunity*, 2011. 34(3): p. 352-63.
519. Greineisen, W.E., et al., Insulin-containing lipogenic stimuli suppress mast cell degranulation potential and up-regulate lipid body biogenesis and eicosanoid secretion in a PPARgamma-independent manner. *J Leukoc Biol*, 2012. 92(3): p. 653-65.

520. Singh, R., Hypothalamic lipophagy and energetic balance. *Aging (Albany NY)*, 2011. 3(10): p. 934-42.
521. Imanishi, Y., V. Gerke, and K. Palczewski, Retinosomes: new insights into intracellular managing of hydrophobic substances in lipid bodies. *J Cell Biol*, 2004. 166(4): p. 447-53.
522. Chong, B.M., et al., Determinants of adipophilin function in milk lipid formation and secretion. *Trends Endocrinol Metab*, 2011. 22(6): p. 211-7.
523. Jeong, J., et al., A test of current models for the mechanism of milk-lipid droplet secretion. *Traffic*, 2013. 14(9): p. 974-86.
524. Pauloin, A. and E. Chanat, Prolactin and epidermal growth factor stimulate adipophilin synthesis in HC11 mouse mammary epithelial cells via the PI3-kinase/Akt/mTOR pathway. *Biochim Biophys Acta*, 2012. 1823(5): p. 987-96.
525. Kraemer, F.B., et al., Cholesterol ester droplets and steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol*, 2013. 371(1-2): p. 15-9.
526. Dyson, M.T., et al., The differential regulation of steroidogenic acute regulatory protein-mediated steroidogenesis by type I and type II PKA in MA-10 cells. *Mol Cell Endocrinol*, 2009. 300(1-2): p. 94-103.
527. Liu, M., et al., Transient scrotal hyperthermia induces lipid droplet accumulation and reveals a different ADFP expression pattern between the testes and liver in mice. *PLoS One*, 2012. 7(10): p. e45694.
528. Furland, N.E., et al., Mild testicular hyperthermia transiently increases lipid droplet accumulation and modifies sphingolipid and glycerophospholipid acyl chains in the rat testis. *Lipids*, 2011. 46(5): p. 443-54.
529. Berrington de Gonzalez, A., et al., Body-mass index and mortality among 1.46 million white adults. *N Engl J Med*, 2010. 363(23): p. 2211-9.
530. Streeper, R.S., et al., Deficiency of the lipid synthesis enzyme, DGAT1, extends longevity in mice. *Aging (Albany NY)*, 2012. 4(1): p. 13-27.
531. Bluher, M., B.B. Kahn, and C.R. Kahn, Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. *Science*, 2003. 299(5606): p. 572-4.
532. Wang, M.C., E.J. O'Rourke, and G. Ruvkun, Fat metabolism links germline stem cells and longevity in *C. elegans*. *Science*, 2008. 322(5903): p. 957-60.
533. O'Rourke, E.J., et al., omega-6 Polyunsaturated fatty acids extend life span through the activation of autophagy. *Genes Dev*, 2013. 27(4): p. 429-40.
534. Gronke, S., et al., Brummer lipase is an evolutionary conserved fat storage regulator in *Drosophila*. *Cell Metab*, 2005. 1(5): p. 323-30.
535. Haemmerle, G., et al., Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. *Science*, 2006. 312(5774): p. 734-7.
536. Chiu, C.H., et al., Effect of a C/EBP gene replacement on mitochondrial biogenesis in fat cells. *Genes Dev*, 2004. 18(16): p. 1970-5.
537. Goldberg, A.A., et al., A novel function of lipid droplets in regulating longevity. *Biochem Soc Trans*, 2009. 37(Pt 5): p. 1050-5.
538. Chen, H.C., et al., Dissociation of obesity and impaired glucose disposal in mice overexpressing acyl coenzyme a:diacylglycerol acyltransferase 1 in white adipose tissue. *Diabetes*, 2002. 51(11): p. 3189-95.
539. Franckhauser, S., et al., Increased fatty acid re-esterification by PEPCK overexpression in adipose tissue leads to obesity without insulin resistance. *Diabetes*, 2002. 51(3): p. 624-30.
540. Le Lay, S. and I. Dugail, Connecting lipid droplet biology and the metabolic syndrome. *Prog Lipid Res*, 2009. 48(3-4): p. 191-5.
541. Vigouroux, C., et al., Molecular mechanisms of human lipodystrophies: from adipocyte lipid droplet to oxidative stress and lipotoxicity. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011. 43(6): p. 862-76.
542. Haque, W.A., et al., Serum adiponectin and leptin levels in patients with lipodystrophies. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. 87(5): p. 2395.
543. Nadra, K., et al., Cell autonomous lipin 1 function is essential for development and maintenance of white and



- brown adipose tissue. *Mol Cell Biol*, 2012. 32(23): p. 4794-810.
544. Capeau, J., et al., Human lipodystrophies: genetic and acquired diseases of adipose tissue. *Endocr Dev*, 2010. 19: p. 1-20.
545. Gale, S.E., et al., A regulatory role for 1-acylglycerol-3-phosphate-O-acyltransferase 2 in adipocyte differentiation. *J Biol Chem*, 2006. 281(16): p. 11082-9.
546. Phan, J., M. Peterfy, and K. Reue, Lipin expression preceding peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is critical for adipogenesis in vivo and in vitro. *J Biol Chem*, 2004. 279(28): p. 29558-64.
547. Michot, C., et al., Combination of lipid metabolism alterations and their sensitivity to inflammatory cytokines in human lipin-1-deficient myoblasts. *Biochim Biophys Acta*, 2013. 1832(12): p. 2103-14.
548. Cao, H., et al., Heterozygous CAV1 frameshift mutations (MIM 601047) in patients with atypical partial lipodystrophy and hypertriglyceridemia. *Lipids Health Dis*, 2008. 7: p. 3.
549. Rajab, A., et al., Fatal cardiac arrhythmia and long-QT syndrome in a new form of congenital generalized lipodystrophy with muscle rippling (CGL4) due to PTRF-CAVIN mutations. *PLoS Genet*, 2010. 6(3): p. e1000874.
550. Hayashi, Y.K., et al., Human PTRF mutations cause secondary deficiency of caveolins resulting in muscular dystrophy with generalized lipodystrophy. *J Clin Invest*, 2009. 119(9): p. 2623-33.
551. Motomura, W., et al., Up-regulation of ADRP in fatty liver in human and liver steatosis in mice fed with high fat diet. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. 340(4): p. 1111-8.
552. Okumura, T., Role of lipid droplet proteins in liver steatosis. *J Physiol Biochem*, 2011. 67(4): p. 629-36.
553. Neuschwander-Tetri, B.A., Nontriglyceride hepatic lipotoxicity: the new paradigm for the pathogenesis of NASH. *Curr Gastroenterol Rep*, 2010. 12(1): p. 49-56.
554. Rector, R.S., et al., Daily exercise increases hepatic fatty acid oxidation and prevents steatosis in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008. 294(3): p. G619-26.
555. Rasineni, K. and C.A. Casey, Molecular mechanism of alcoholic fatty liver. *Indian J Pharmacol*, 2012. 44(3): p. 299-303.
556. Holloway, G.P., et al., In obese Zucker rats, lipids accumulate in the heart despite normal mitochondrial content, morphology and long-chain fatty acid oxidation. *J Physiol*, 2011. 589(Pt 1): p. 169-80.
557. Yuan, Y., P. Li, and J. Ye, Lipid homeostasis and the formation of macrophage-derived foam cells in atherosclerosis. *Protein Cell*, 2012. 3(3): p. 173-81.
558. Paul, A., et al., Deficiency of adipose differentiation-related protein impairs foam cell formation and protects against atherosclerosis. *Circ Res*, 2008. 102(12): p. 1492-501.
559. Nicolaou, G., A.H. Goodall, and C. Erridge, Diverse bacteria promote macrophage foam cell formation via Toll-like receptor-dependent lipid body biosynthesis. *J Atheroscler Thromb*, 2012. 19(2): p. 137-48.
560. Cole, N.B., et al., Lipid droplet binding and oligomerization properties of the Parkinson's disease protein alpha-synuclein. *J Biol Chem*, 2002. 277(8): p. 6344-52.
561. Boussahmain, C., M.C. Mochel, and M.P. Hoang, Perilipin and adipophilin expression in sebaceous carcinoma and mimics. *Hum Pathol*, 2013. 44(9): p. 1811-6.
562. Kurisu, Y., et al., Intraductal lipid-rich carcinoma of the breast with a component of glycogen-rich carcinoma. *J Breast Cancer*, 2012. 15(1): p. 135-8.
563. Shiu, R.P. and J.A. Paterson, Alteration of cell shape, adhesion, and lipid accumulation in human breast cancer cells (T-47D) by human prolactin and growth hormone. *Cancer Res*, 1984. 44(3): p. 1178-86.
564. Ambrosio, M.R., et al., The alteration of lipid metabolism in Burkitt lymphoma identifies a novel marker: adipophilin. *PLoS One*, 2012. 7(8): p. e44315.
565. Qi, W., et al., FOXO3 growth inhibition of colonic cells is dependent on intraepithelial lipid droplet density. *J Biol Chem*, 2013. 288(23): p. 16274-81.
566. Yu, M., et al., Expression of CIDE proteins in clear cell renal cell carcinoma and their prognostic significance. *Mol Cell Biochem*, 2013. 378(1-2): p. 145-51.



567. Yao, M., et al., Gene expression analysis of renal carcinoma: adipose differentiation-related protein as a potential diagnostic and prognostic biomarker for clear-cell renal carcinoma. *J Pathol*, 2005. 205(3): p. 377-87.
568. Barba, I., M.E. Cabanas, and C. Arus, The relationship between nuclear magnetic resonance-visible lipids, lipid droplets, and cell proliferation in cultured C6 cells. *Cancer Res*, 1999. 59(8): p. 1861-8.
569. Matyja, E., et al., Unclassified glioneuronal tumor with advanced lipidization. *Brain Tumor Pathol*, 2011. 28(3): p. 265-71.
570. Pan, X., et al., The size of cytoplasmic lipid droplets varies between tumour cell lines of the nervous system: a <sup>1</sup>H NMR spectroscopy study. *MAGMA*, 2012. 25(6): p. 479-85.
571. Menendez, J.A. and R. Lupu, Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer*, 2007. 7(10): p. 763-77.
572. Takahiro, T., K. Shinichi, and S. Toshimitsu, Expression of fatty acid synthase as a prognostic indicator in soft tissue sarcomas. *Clin Cancer Res*, 2003. 9(6): p. 2204-12.
573. Accioly, M.T., et al., Lipid bodies are reservoirs of cyclooxygenase-2 and sites of prostaglandin-E2 synthesis in colon cancer cells. *Cancer Res*, 2008. 68(6): p. 1732-40.
574. Mycielska, M.E., et al., Citrate enhances in vitro metastatic behaviours of PC-3M human prostate cancer cells: status of endogenous citrate and dependence on aconitase and fatty acid synthase. *Int J Biochem Cell Biol*, 2006. 38(10): p. 1766-77.
575. Antalis, C.J., et al., Migration of MDA-MB-231 breast cancer cells depends on the availability of exogenous lipids and cholesterol esterification. *Clin Exp Metastasis*, 2011. 28(8): p. 733-41.
576. Navarro-Tito, N., et al., Oleic acid promotes migration on MDA-MB-231 breast cancer cells through an arachidonic acid-dependent pathway. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010. 42(2): p. 306-17.
577. Zoula, S., et al., Pimonicidazole binding in C6 rat brain glioma: relation with lipid droplet detection. *Br J Cancer*, 2003. 88(9): p. 1439-44.
578. Carracedo, A., L.C. Cantley, and P.P. Pandolfi, Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight. *Nat Rev Cancer*, 2013. 13(4): p. 227-32.
579. Liu, Y., Fatty acid oxidation is a dominant bioenergetic pathway in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2006. 9(3): p. 230-4.
580. Samudio, I., et al., Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction. *J Clin Invest*, 2010. 120(1): p. 142-56.
581. Nieman, K.M., et al., Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat Med*, 2011. 17(11): p. 1498-503.
582. Schafer, Z.T., et al., Antioxidant and oncogene rescue of metabolic defects caused by loss of matrix attachment. *Nature*, 2009. 461(7260): p. 109-13.
583. Carracedo, A., et al., A metabolic prosurvival role for PML in breast cancer. *J Clin Invest*, 2012. 122(9): p. 3088-100.
584. Brown, M.D., et al., Promotion of prostatic metastatic migration towards human bone marrow stroma by Omega 6 and its inhibition by Omega 3 PUFAs. *Br J Cancer*, 2006. 94(6): p. 842-53.
585. Hirano, T., et al., Enhancement of adipogenesis induction by conditioned media obtained from cancer cells. *Cancer Lett*, 2008. 268(2): p. 286-94.
586. Gazi, E., et al., Direct evidence of lipid translocation between adipocytes and prostate cancer cells with imaging FTIR microspectroscopy. *J Lipid Res*, 2007. 48(8): p. 1846-56.
587. Bosch, M., et al., Caveolin-1 deficiency causes cholesterol-dependent mitochondrial dysfunction and apoptotic susceptibility. *Curr Biol*, 2011. 21(8): p. 681-6.
588. Kassan, A., et al., Acyl-CoA synthetase 3 promotes lipid droplet biogenesis in ER microdomains. *J Cell Biol*, 2013. 203(6): p. 985-1001.
589. Herms, A., et al., Cell-to-cell heterogeneity in lipid droplets suggests a mechanism to reduce lipotoxicity. *Curr Biol*, 2013. 23(15): p. 1489-96.
590. Capozza, F., et al., Absence of caveolin-1 sensitizes mouse skin to carcinogen-induced epidermal hyperplasia and tumor formation. *Am J Pathol*, 2003. 162(6): p. 2029-39.

591. Hayashi, K., et al., Invasion activating caveolin-1 mutation in human scirrhous breast cancers. *Cancer Res*, 2001. 61(6): p. 2361-4.
592. Kim, C.A., et al., Association of a homozygous nonsense caveolin-1 mutation with Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008. 93(4): p. 1129-34.
593. McNally, E.M., et al., Caveolin-3 in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*, 1998. 7(5): p. 871-7.
594. Minetti, C., et al., Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Nat Genet*, 1998. 18(4): p. 365-8.
595. Williams, T.M., et al., Loss of caveolin-1 gene expression accelerates the development of dysplastic mammary lesions in tumor-prone transgenic mice. *Mol Biol Cell*, 2003. 14(3): p. 1027-42.
596. Woodman, S.E., et al., Caveolinopathies: mutations in caveolin-3 cause four distinct autosomal dominant muscle diseases. *Neurology*, 2004. 62(4): p. 538-43.
597. Razani, B., et al., Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J Biol Chem*, 2001. 276(41): p. 38121-38.
598. Pelicano, H., et al., Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene*, 2006. 25(34): p. 4633-46.
599. Vander Heiden, M.G., L.C. Cantley, and C.B. Thompson, Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 2009. 324(5930): p. 1029-33.
600. Bonnet, S., et al., A mitochondria-K<sup>+</sup> channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell*, 2007. 11(1): p. 37-51.
601. Turrens, J.F., Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*, 2003. 552(Pt 2): p. 335-44.
602. Simon, H.U., A. Haj-Yehia, and F. Levi-Schaffer, Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis*, 2000. 5(5): p. 415-8.
603. Grande-Garcia, A., et al., Caveolin-1 regulates cell polarization and directional migration through Src kinase and Rho GTPases. *J Cell Biol*, 2007. 177(4): p. 683-94.
604. Kim, J.J., et al., TNF-alpha-induced ROS production triggering apoptosis is directly linked to Romo1 and Bcl-X(L). *Cell Death Differ*, 2010. 17(9): p. 1420-34.
605. Murphy, M.P., How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*, 2009. 417(1): p. 1-13.
606. Smart, E.J., et al., A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J Biol Chem*, 1996. 271(46): p. 29427-35.
607. Mari, M., et al., Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell Metab*, 2006. 4(3): p. 185-98.
608. Cooper, R.A., Influence of increased membrane cholesterol on membrane fluidity and cell function in human red blood cells. *J Supramol Struct*, 1978. 8(4): p. 413-30.
609. Fernandez, A., et al., Mitochondrial cholesterol loading exacerbates amyloid beta peptide-induced inflammation and neurotoxicity. *J Neurosci*, 2009. 29(20): p. 6394-405.
610. Lippincott-Schwartz, J., E. Snapp, and A. Kenworthy, Studying protein dynamics in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. 2(6): p. 444-56.
611. Wolins, N.E., et al., S3-12, Adipophilin, and TIP47 package lipid in adipocytes. *J Biol Chem*, 2005. 280(19): p. 19146-55.
612. Soupene, E., et al., Activity of the acyl-CoA synthetase ACSL6 isoforms: role of the fatty acid Gate-domains. *BMC Biochem*, 2010. 11: p. 18.
613. Yin, C., et al., Lipid accumulation mediated by adiponectin in C2C12 myogenesis. *BMB Rep*, 2009. 42(10): p. 667-72.
614. Loo, L.H., et al., Heterogeneity in the physiological states and pharmacological responses of differentiating 3T3-L1 preadipocytes. *J Cell Biol*, 2009. 187(3): p. 375-84.
615. Le, T.T. and J.X. Cheng, Single-cell profiling reveals the origin of phenotypic variability in adipogenesis. *PLoS One*, 2009. 4(4): p. e5189.
616. Gocze, P.M. and D.A. Freeman, Factors underlying the variability of lipid droplet fluorescence in MA-10 Le-

- ydig tumor cells. *Cytometry*, 1994. 17(2): p. 151-8.
617. Kleiner, D.E., et al., Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 2005. 41(6): p. 1313-21.
618. Higgins, G.M. and R.M. Anderson, Experimental Pathology of the Liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol*, 1931. 12: p. 186-202.
619. Shahrezaei, V. and P.S. Swain, The stochastic nature of biochemical networks. *Curr Opin Biotechnol*, 2008. 19(4): p. 369-74.
620. Acar, M., J.T. Mettetal, and A. van Oudenaarden, Stochastic switching as a survival strategy in fluctuating environments. *Nat Genet*, 2008. 40(4): p. 471-5.
621. Gwinn, D.M., et al., AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell*, 2008. 30(2): p. 214-26.
622. Jones, R.G., et al., AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol Cell*, 2005. 18(3): p. 283-93.
623. Graham, N.A., et al., Glucose deprivation activates a metabolic and signaling amplification loop leading to cell death. *Mol Syst Biol*, 2012. 8: p. 589.
624. Lee, Y.J., et al., Glucose deprivation-induced cytotoxicity in drug resistant human breast carcinoma MCF-7/ADR cells: role of c-myc and bcl-2 in apoptotic cell death. *J Cell Sci*, 1997. 110 ( Pt 5): p. 681-6.
625. Caro-Maldonado, A., et al., Glucose deprivation induces an atypical form of apoptosis mediated by caspase-8 in Bax-, Bak-deficient cells. *Cell Death Differ*, 2010. 17(8): p. 1335-44.
626. Alves, N.L., et al., The Noxa/Mcl-1 axis regulates susceptibility to apoptosis under glucose limitation in dividing T cells. *Immunity*, 2006. 24(6): p. 703-16.
627. den Hartigh, L.J., et al., Fatty acids from very low-density lipoprotein lipolysis products induce lipid droplet accumulation in human monocytes. *J Immunol*, 2010. 184(7): p. 3927-36.
628. Maher, J.C., A. Krishan, and T.J. Lampidis, Greater cell cycle inhibition and cytotoxicity induced by 2-deoxy-D-glucose in tumor cells treated under hypoxic vs aerobic conditions. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2004. 53(2): p. 116-22.
629. Meijering, E., O. Dzyubachyk, and I. Smal, Methods for cell and particle tracking. *Methods Enzymol*, 2012. 504: p. 183-200.
630. Lin, X., K. Shim, and J. Odle, Carnitine palmitoyltransferase I control of acetogenesis, the major pathway of fatty acid {beta}-oxidation in liver of neonatal swine. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2010. 298(5): p. R1435-43.
631. Kawamura, N. and Y. Kishimoto, Characterization of water-soluble products of palmitic acid beta-oxidation by a rat brain preparation. *J Neurochem*, 1981. 36(5): p. 1786-91.
632. Lin, X., S.H. Adams, and J. Odle, Acetate represents a major product of heptanoate and octanoate beta-oxidation in hepatocytes isolated from neonatal piglets. *Biochem J*, 1996. 318 ( Pt 1): p. 235-40.
633. Gomes, L.C., G. Di Benedetto, and L. Scorrano, During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat Cell Biol*, 2011. 13(5): p. 589-98.
634. Rambold, A.S., et al., Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. 108(25): p. 10190-5.
635. Rieske, J.S., et al., Factors affecting the binding of antimycin A to complex 3 of the mitochondrial respiratory chain. *J Biol Chem*, 1967. 242(21): p. 4888-96.
636. Lardy, H.A., D. Johnson, and M.W. Mc, Antibiotics as tools for metabolic studies. I. A survey of toxic antibiotics in respiratory, phosphorylative and glycolytic systems. *Arch Biochem Biophys*, 1958. 78(2): p. 587-97.
637. Haga, N., et al., Mitochondria regulate the unfolded protein response leading to cancer cell survival under glucose deprivation conditions. *Cancer Sci*, 2010. 101(5): p. 1125-32.
638. Hardie, D.G., F.A. Ross, and S.A. Hawley, AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012. 13(4): p. 251-62.
639. Li, L., Y. Chen, and S.B. Gibson, Starvation-induced autophagy is regulated by mitochondrial reactive oxygen

- species leading to AMPK activation. *Cell Signal*, 2013. 25(1): p. 50-65.
640. Corton, J.M., et al., 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur J Biochem*, 1995. 229(2): p. 558-65.
641. Handa, N., et al., Structural basis for compound C inhibition of the human AMP-activated protein kinase alpha2 subunit kinase domain. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2011. 67(Pt 5): p. 480-7.
642. Huang, Y.A., et al., Microtubule-associated type II protein kinase A is important for neurite elongation. *PLoS One*, 2013. 8(8): p. e73890.
643. Lomakin, A.J., et al., Stimulation of the CLIP-170--dependent capture of membrane organelles by microtubules through fine tuning of microtubule assembly dynamics. *Mol Biol Cell*, 2011. 22(21): p. 4029-37.
644. Dhamodharan, R. and P. Wadsworth, Modulation of microtubule dynamic instability in vivo by brain microtubule associated proteins. *J Cell Sci*, 1995. 108 ( Pt 4): p. 1679-89.
645. Perez, F., et al., CLIP-170 highlights growing microtubule ends in vivo. *Cell*, 1999. 96(4): p. 517-27.
646. Arnal, I. and R.H. Wade, How does taxol stabilize microtubules? *Curr Biol*, 1995. 5(8): p. 900-8.
647. Xiao, H., et al., Insights into the mechanism of microtubule stabilization by Taxol. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(27): p. 10166-73.
648. Schulze, E., et al., Posttranslational modification and microtubule stability. *J Cell Biol*, 1987. 105(5): p. 2167-77.
649. Wloga, D. and J. Gaertig, Post-translational modifications of microtubules. *J Cell Sci*, 2010. 123(Pt 20): p. 3447-55.
650. Dowdy, S.C., et al., Histone deacetylase inhibitors and paclitaxel cause synergistic effects on apoptosis and microtubule stabilization in papillary serous endometrial cancer cells. *Mol Cancer Ther*, 2006. 5(11): p. 2767-76.
651. Geeraert, C., et al., Starvation-induced hyperacetylation of tubulin is required for the stimulation of autophagy by nutrient deprivation. *J Biol Chem*, 2010. 285(31): p. 24184-94.
652. Friedman, J.R., et al., ER sliding dynamics and ER-mitochondrial contacts occur on acetylated microtubules. *J Cell Biol*, 2010. 190(3): p. 363-75.
653. Misawa, T., et al., Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome. *Nat Immunol*, 2013. 14(5): p. 454-60.
654. Hubbert, C., et al., HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature*, 2002. 417(6887): p. 455-8.
655. Zilberman, Y., et al., Regulation of microtubule dynamics by inhibition of the tubulin deacetylase HDAC6. *J Cell Sci*, 2009. 122(Pt 19): p. 3531-41.
656. Kalebic, N., et al., alphaTAT1 is the major alpha-tubulin acetyltransferase in mice. *Nat Commun*, 2013. 4: p. 1962.
657. Akella, J.S., et al., MEC-17 is an alpha-tubulin acetyltransferase. *Nature*, 2010. 467(7312): p. 218-22.
658. Fonrose, X., et al., Parthenolide inhibits tubulin carboxypeptidase activity. *Cancer Res*, 2007. 67(7): p. 3371-8.
659. Fassett, J.T., et al., AMPK attenuates microtubule proliferation in cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2013. 304(5): p. H749-58.
660. Rogers, K.S., E.S. Higgins, and W.M. Grogan, Influence of dietary cholesterol on mitochondrial function in the rat. *J Nutr*, 1980. 110(2): p. 248-54.
661. Echegoyen, S., et al., Cholesterol increase in mitochondria: its effect on inner-membrane functions, submitochondrial localization and ultrastructural morphology. *Biochem J*, 1993. 289 ( Pt 3): p. 703-8.
662. Yu, W., et al., Altered cholesterol metabolism in Niemann-Pick type C1 mouse brains affects mitochondrial function. *J Biol Chem*, 2005. 280(12): p. 11731-9.
663. Ramzan, R., et al., Mitochondrial respiration and membrane potential are regulated by the allosteric ATP-

- inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta*, 2010. 1797(9): p. 1672-80.
664. Fridolfsson, H.N. and H.H. Patel, Caveolin and caveolae in age associated cardiovascular disease. *J Geriatr Cardiol*, 2013. 10(1): p. 66-74.
665. Mei, S., et al., Prolonged exposure to insulin induces mitochondrion-derived oxidative stress through increasing mitochondrial cholesterol content in hepatocytes. *Endocrinology*, 2012. 153(5): p. 2120-9.
666. Meyer, C., et al., Caveolin-1 abrogates TGF-beta mediated hepatocyte apoptosis. *Cell Death Dis*, 2013. 4: p. e466.
667. Asterholm, I.W., et al., Altered mitochondrial function and metabolic inflexibility associated with loss of caveolin-1. *Cell Metab*, 2012. 15(2): p. 171-85.
668. Fernandez-Rojo, M.A., et al., Caveolin-1 is necessary for hepatic oxidative lipid metabolism: evidence for crosstalk between caveolin-1 and bile acid signaling. *Cell Rep*, 2013. 4(2): p. 238-47.
669. Li, W.P., et al., Cell-specific targeting of caveolin to caveolae, secretory vesicles, cytoplasm or mitochondria. *J Cell Sci*, 2001. 114(Pt 7): p. 1397-408.
670. Hayashi, T., et al., MAM: more than just a housekeeper. *Trends Cell Biol*, 2009. 19(2): p. 81-8.
671. Sano, R., et al., GM1-ganglioside accumulation at the mitochondria-associated ER membranes links ER stress to Ca(2+)-dependent mitochondrial apoptosis. *Mol Cell*, 2009. 36(3): p. 500-11.
672. Fu, Y., et al., Expression of caveolin-1 enhances cholesterol efflux in hepatic cells. *J Biol Chem*, 2004. 279(14): p. 14140-6.
673. Jefcoate, C., High-flux mitochondrial cholesterol trafficking, a specialized function of the adrenal cortex. *J Clin Invest*, 2002. 110(7): p. 881-90.
674. Brouillet, E., et al., 3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. *J Neurochem*, 2005. 95(6): p. 1521-40.
675. Querfurth, H.W. and F.M. LaFerla, Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, 2010. 362(4): p. 329-44.
676. Head, B.P., et al., Loss of caveolin-1 accelerates neurodegeneration and aging. *PLoS One*, 2010. 5(12): p. e15697.
677. Ashrafian, H., et al., Neurodegenerative disease and obesity: what is the role of weight loss and bariatric interventions? *Metab Brain Dis*, 2013. 28(3): p. 341-53.
678. Sriram, K., et al., Obesity exacerbates chemically induced neurodegeneration. *Neuroscience*, 2002. 115(4): p. 1335-46.
679. Bruce-Keller, A.J., J.N. Keller, and C.D. Morrison, Obesity and vulnerability of the CNS. *Biochim Biophys Acta*, 2009. 1792(5): p. 395-400.
680. Susaki, E. and K.I. Nakayama, An animal model manifesting neurodegeneration and obesity. *Aging (Albany NY)*, 2010. 2(7): p. 453-6.
681. Cai, D., Neuroinflammation and neurodegeneration in overnutrition-induced diseases. *Trends Endocrinol Metab*, 2013. 24(1): p. 40-7.
682. Vorgerd, M., et al., A sporadic case of rippling muscle disease caused by a de novo caveolin-3 mutation. *Neurology*, 2001. 57(12): p. 2273-7.
683. Schwencke, C., et al., Caveolae and caveolin in transmembrane signaling: Implications for human disease. *Cardiovasc Res*, 2006. 70(1): p. 42-9.
684. Goetz, J.G., et al., Caveolin-1 in tumor progression: the good, the bad and the ugly. *Cancer Metastasis Rev*, 2008. 27(4): p. 715-35.
685. Murata, T., et al., Reexpression of caveolin-1 in endothelium rescues the vascular, cardiac, and pulmonary defects in global caveolin-1 knockout mice. *J Exp Med*, 2007. 204(10): p. 2373-82.
686. Pol, A., S.P. Gross, and R. Parton, Biogenesis of the multifunctional lipid droplet: Lipids, proteins, and sites *J Cell Biol*, 2014. 204 (5).
687. Milewska, M., J. McRedmond, and P.C. Byrne, Identification of novel spartin-interactors shows spartin is a multifunctional protein. *J Neurochem*, 2009. 111(4): p. 1022-30.
688. Velikkakath, A.K., et al., Mammalian Atg2 proteins are essential for autophagosome formation and important

- for regulation of size and distribution of lipid droplets. *Mol Biol Cell*, 2012. 23(5): p. 896-909.
689. Thattai, M. and A. van Oudenaarden, Stochastic gene expression in fluctuating environments. *Genetics*, 2004. 167(1): p. 523-30.
690. Ghosh, S., et al., Phenotypic heterogeneity in mycobacterial stringent response. *BMC Syst Biol*, 2011. 5: p. 18.
691. Korge, P. and J.N. Weiss, Redox regulation of endogenous substrate oxidation by cardiac mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. 291(3): p. H1436-45.
692. Browning, J.D. and J.D. Horton, Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest*, 2004. 114(2): p. 147-52.
693. Kita, T., et al., Possible role of mitochondrial remodelling on cellular triacylglycerol accumulation. *J Biochem*, 2009. 146(6): p. 787-96.
694. Alexander, A., et al., ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(9): p. 4153-8.
695. Nakano, A., et al., AMPK controls the speed of microtubule polymerization and directional cell migration through CLIP-170 phosphorylation. *Nat Cell Biol*, 2010. 12(6): p. 583-90.
696. Bae, H.B., et al., AMP-activated protein kinase enhances the phagocytic ability of macrophages and neutrophils. *FASEB J*, 2011. 25(12): p. 4358-68.
697. Yoshida, H. and M. Goedert, Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by AMPK-related kinases. *J Neurochem*, 2012. 120(1): p. 165-76.
698. Thornton, C., et al., AMP-activated protein kinase (AMPK) is a tau kinase, activated in response to amyloid beta-peptide exposure. *Biochem J*, 2011. 434(3): p. 503-12.
699. Vazquez-Martin, A., et al., Mitotic kinase dynamics of the active form of AMPK (phospho-AMPKalphaThr172) in human cancer cells. *Cell Cycle*, 2009. 8(5): p. 788-91.
700. Vazquez-Martin, A., C. Oliveras-Ferraro, and J.A. Menendez, The active form of the metabolic sensor: AMP-activated protein kinase (AMPK) directly binds the mitotic apparatus and travels from centrosomes to the spindle midzone during mitosis and cytokinesis. *Cell Cycle*, 2009. 8(15): p. 2385-98.
701. Thaiparambil, J.T., C.M. Eggers, and A.I. Marcus, AMPK regulates mitotic spindle orientation through phosphorylation of myosin regulatory light chain. *Mol Cell Biol*, 2012. 32(16): p. 3203-17.
702. Kashina, A.S., et al., Protein kinase A, which regulates intracellular transport, forms complexes with molecular motors on organelles. *Curr Biol*, 2004. 14(20): p. 1877-81.
703. Lee, H.S., et al., Phosphorylation controls autoinhibition of cytoplasmic linker protein-170. *Mol Biol Cell*, 2010. 21(15): p. 2661-73.
704. Matsuyama, A., et al., In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *EMBO J*, 2002. 21(24): p. 6820-31.
705. Khawaja, S., G.G. Gundersen, and J.C. Bulinski, Enhanced stability of microtubules enriched in deetyrosinated tubulin is not a direct function of deetyrosination level. *J Cell Biol*, 1988. 106(1): p. 141-9.
706. Webster, D.R., et al., Detyrosination of alpha tubulin does not stabilize microtubules in vivo. *J Cell Biol*, 1990. 111(1): p. 113-22.
707. Kreis, T.E., Microtubules containing deetyrosinated tubulin are less dynamic. *EMBO J*, 1987. 6(9): p. 2597-606.
708. Peris, L., et al., Tubulin tyrosination is a major factor affecting the recruitment of CAP-Gly proteins at microtubule plus ends. *J Cell Biol*, 2006. 174(6): p. 839-49.
709. Xu, J., et al., Casein kinase 2 reverses tail-independent inactivation of kinesin-1. *Nat Commun*, 2012. 3: p. 754.
710. Liao, G. and G.G. Gundersen, Kinesin is a candidate for cross-bridging microtubules and intermediate filaments. Selective binding of kinesin to deetyrosinated tubulin and vimentin. *J Biol Chem*, 1998. 273(16): p. 9797-803.
711. Dunn, S., et al., Differential trafficking of Kif5c on tyrosinated and deetyrosinated microtubules in live cells. *J Cell Sci*, 2008. 121(Pt 7): p. 1085-95.
712. Lin, S.X., G.G. Gundersen, and F.R. Maxfield, Export from pericentriolar endocytic recycling compartment to

- cell surface depends on stable, detyrosinated (glu) microtubules and kinesin. *Mol Biol Cell*, 2002. 13(1): p. 96-109.
713. Gurland, G. and G.G. Gundersen, Stable, detyrosinated microtubules function to localize vimentin intermediate filaments in fibroblasts. *J Cell Biol*, 1995. 131(5): p. 1275-90.
714. Nekrasova, O.E., et al., Vimentin intermediate filaments modulate the motility of mitochondria. *Mol Biol Cell*, 2011. 22(13): p. 2282-9.
715. Bartolini, F. and G.G. Gundersen, Generation of noncentrosomal microtubule arrays. *J Cell Sci*, 2006. 119(Pt 20): p. 4155-63.
716. Yano, T., et al., The association of microtubules with tight junctions is promoted by cingulin phosphorylation by AMPK. *J Cell Biol*, 2013. 203(4): p. 605-14.
717. Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976. 72: p. 248-54.
718. Zor, T. and Z. Selinger, Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Anal Biochem*, 1996. 236(2): p. 302-8.
719. Asp, L., et al., Early stages of Golgi vesicle and tubule formation require diacylglycerol. *Mol Biol Cell*, 2009. 20(3): p. 780-90.
720. Lee, Y.H., et al., Simple flow cytometric method used to assess lipid accumulation in fat cells. *J Lipid Res*, 2004. 45(6): p. 1162-7.
721. Owen, D.M. and K. Gaus, Optimized time-gated generalized polarization imaging of Laurdan and di-4-ANEPPDHQ for membrane order image contrast enhancement. *Microsc Res Tech*, 2010. 73(6): p. 618-22.
722. Frezza, C., S. Cipolat, and L. Scorrano, Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nat Protoc*, 2007. 2(2): p. 287-95.
698. Korge, P. and J.N. Weiss, Redox regulation of endogenous substrate oxidation by cardiac mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. 291(3): p. H1436-45.
699. Browning, J.D. and J.D. Horton, Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest*, 2004. 114(2): p. 147-52.
700. Kita, T., et al., Possible role of mitochondrial remodelling on cellular triacylglycerol accumulation. *J Biochem*, 2009. 146(6): p. 787-96.
701. Alexander, A., et al., ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(9): p. 4153-8.
702. Yoshida, H. and M. Goedert, Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by AMPK-related kinases. *J Neurochem*, 2012. 120(1): p. 165-76.
703. Thornton, C., et al., AMP-activated protein kinase (AMPK) is a tau kinase, activated in response to amyloid beta-peptide exposure. *Biochem J*, 2011. 434(3): p. 503-12.
704. Vazquez-Martin, A., et al., Mitotic kinase dynamics of the active form of AMPK (phospho-AMPK $\alpha$ Thr172) in human cancer cells. *Cell Cycle*, 2009. 8(5): p. 788-91.
705. Kashina, A.S., et al., Protein kinase A, which regulates intracellular transport, forms complexes with molecular motors on organelles. *Curr Biol*, 2004. 14(20): p. 1877-81.
706. Lee, H.S., et al., Phosphorylation controls autoinhibition of cytoplasmic linker protein-170. *Mol Biol Cell*, 2010. 21(15): p. 2661-73.
707. Matsuyama, A., et al., In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *EMBO J*, 2002. 21(24): p. 6820-31.
708. Khawaja, S., G.G. Gundersen, and J.C. Bulinski, Enhanced stability of microtubules enriched in detyrosinated tubulin is not a direct function of detyrosination level. *J Cell Biol*, 1988. 106(1): p. 141-9.
709. Webster, D.R., et al., Detyrosination of alpha tubulin does not stabilize microtubules in vivo. *J Cell Biol*, 1990. 111(1): p. 113-22.
710. Kreis, T.E., Microtubules containing detyrosinated tubulin are less dynamic. *EMBO J*, 1987. 6(9): p. 2597-606.
711. Peris, L., et al., Tubulin tyrosination is a major factor affecting the recruitment of CAP-Gly proteins at micro-

- tubule plus ends. *J Cell Biol*, 2006. 174(6): p. 839-49.
712. Xu, J., et al., Casein kinase 2 reverses tail-independent inactivation of kinesin-1. *Nat Commun*, 2012. 3: p. 754.
713. Liao, G. and G.G. Gundersen, Kinesin is a candidate for cross-bridging microtubules and intermediate filaments. Selective binding of kinesin to detyrosinated tubulin and vimentin. *J Biol Chem*, 1998. 273(16): p. 9797-803.
714. Dunn, S., et al., Differential trafficking of Kif5c on tyrosinated and detyrosinated microtubules in live cells. *J Cell Sci*, 2008. 121(Pt 7): p. 1085-95.
715. Lin, S.X., G.G. Gundersen, and F.R. Maxfield, Export from pericentriolar endocytic recycling compartment to cell surface depends on stable, detyrosinated (glu) microtubules and kinesin. *Mol Biol Cell*, 2002. 13(1): p. 96-109.
716. Gurland, G. and G.G. Gundersen, Stable, detyrosinated microtubules function to localize vimentin intermediate filaments in fibroblasts. *J Cell Biol*, 1995. 131(5): p. 1275-90.
717. Nekrasova, O.E., et al., Vimentin intermediate filaments modulate the motility of mitochondria. *Mol Biol Cell*, 2011. 22(13): p. 2282-9.
718. Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976. 72: p. 248-54.
719. Zor, T. and Z. Selinger, Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Anal Biochem*, 1996. 236(2): p. 302-8.
720. Asp, L., et al., Early stages of Golgi vesicle and tubule formation require diacylglycerol. *Mol Biol Cell*, 2009. 20(3): p. 780-90.
721. Lee, Y.H., et al., Simple flow cytometric method used to assess lipid accumulation in fat cells. *J Lipid Res*, 2004. 45(6): p. 1162-7.
722. Owen, D.M. and K. Gaus, Optimized time-gated generalized polarization imaging of Laurdan and di-4-ANEPPDHQ for membrane order image contrast enhancement. *Microsc Res Tech*, 2010. 73(6): p. 618-22.
723. Frezza, C., S. Cipolat, and L. Scorrano, Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nat Protoc*, 2007. 2(2): p. 287-95.





