

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular  
Facultad de Biología  
Universidad de Barcelona

**PAPEL DE LAS CAVEOLAS/CAVEOLINA-1  
EN LA FISIOLÓGÍA DEL ADIPOCITO**

Elena González Muñoz  
Tesis Doctoral  
Barcelona, 2007

## **DISCUSIÓN**



## 1 Efecto de los agentes que unen o extraen colesterol de las membranas sobre la estructura y función de los *rafts* lipídicos/ caveolas en adipocitos 3T3L1

Se ha descrito que los *rafts* lipídicos funcionan como plataformas donde se asocian diferentes clases de proteínas como son las proteínas ancladas a glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), proteínas transmembrana y proteínas diaciladas. La lista de funciones celulares que dependen de los *rafts* lipídicos está en continua expansión. De hecho, se han involucrado en la distribución de lípidos y proteínas de la superficie celular (Simons *et al.*, 1997a), en la segregación y concentración de proteínas (Brown *et al.*, 1998a), en la señalización y en la generación y mantenimiento de la polaridad celular (Simons *et al.*, 2000b).

Los *rafts* lipídicos también juegan un papel importante en algunas cascadas de transducción de señales (Toomre *et al.*, 2000), como es el caso de la vía de señalización del receptor de insulina (Baumann *et al.*, 2000; Chiang *et al.*, 2001) y la activación de respuestas inmunes (Langlet *et al.*, 2000).

Como ya se ha expuesto en la Introducción, las caveolas son un subtipo de *raft* lipídico especialmente enriquecido en esfingolípidos, glicoesfingolípidos y colesterol, que se caracterizan por la presencia de la proteína caveolina (Anderson, 1998; Kurzchalia *et al.*, 1999). A las caveolas se las implica en numerosos procesos celulares como la potocitosis, la transcitosis, la endocitosis, la transducción de señales, el transporte y la homeostasis de colesterol, tumorigénesis, la integridad y función de las gotas lipídicas (LDs) (Liu *et al.*, 2002). Además a partir de las características fenotípicas de los ratones deficientes en caveolina-1 se ha demostrado que las caveolas y caveolina-1 tienen un papel clave en la regulación del metabolismo energético (Cohen *et al.*, 2003b).

Una de las funciones más estudiadas de las caveolas es su implicación en mecanismos de transducción de señales. Así, numerosos trabajos han aportado evidencias de que la caveolina puede interactuar directamente con muchas de las moléculas de transducción de señal que están en las caveolas, mediante un dominio hidrofóbico conservado de 20 aminoácidos llamado dominio *scaffolding* de la caveolina (CSD; residuos 82-101 de la caveolina)(Couet *et al.*, 1997a). Aunque caveolina-1, en particular su dominio CSD, actúa en muchos casos como regulador negativo de la señalización (quinasas de familia Src, H-Ras, o eNOS) (Li *et al.*, 1995b; Song *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1996a), en otros casos puede tener también un efecto activador en la transducción de la señal (receptor  $\beta_2$ -adrenérgico)(Czarny *et al.*, 1999), por ejemplo en la señalización de la insulina (Yamamoto *et al.*, 1998).

Como ya se explicó en la Introducción, datos del grupo de los Drs. Saltiel y Pessin, han mostrado la importancia de las caveolas en la señalización de insulina estimulando el transporte de glucosa en adipocitos 3T3L1, postulando que en la acción de la insulina es indispensable la activación de dos vías de señalización: una dependiente de PI3K y otra independiente, que depende de las proteínas c-Cbl y TC10 y se asocia con *rafts* lipídicos/caveolas (Baumann *et al.*, 2000; Pessin *et al.*, 2000; Chiang *et al.*, 2001).

Además, en la bibliografía se han descrito que los tratamientos con drogas que unen y extraen el colesterol de la membrana plasmática disminuyen el transporte de glucosa estimulado por insulina (Gustavsson *et al.*, 1999; Parpal *et al.*, 2001).

Nos planteamos como primer objetivo, analizar el efecto de los agentes que unen o extraen colesterol de la membrana sobre la acción de la insulina activando las vías de señalización que llevan al incremento del transporte de glucosa y estimulando el transporte de glucosa. Los agentes nistatina y filipina se unen al colesterol de la membrana formando

complejos, mientras que  $\beta$ -ciclodextrina (CD) y metil- $\beta$ -ciclodextrina (MCD) se unen al colesterol de la membrana y lo extraen, modificando así el contenido de colesterol y de caveolina-1 (que está unido al colesterol) de las membranas.

En primer lugar comprobamos por microscopía electrónica que ambos tipos de tratamientos efectivamente alteraban la estructura de las caveolas, como se ve en la figura 1 de la sección Resultados, nistatina y MCD provocan un aplanamiento y una disgregación de las caveolas respectivamente. El efecto de la filipina no fue tan drástico aunque las caveolas resultantes presentaban forma de anillo. El efecto de estas drogas coincide con los resultados publicados Chang et al. (1992) y Schnitzer *et al.* (1994).

Como vimos en la figura 2 de los resultados, sólo los tratamientos que extraen el colesterol de las membranas (CD y MCD) ,y por tanto altera no sólo la estructura de las caveolas, sino también su composición, disminuyendo la cantidad de colesterol en la membrana casi a la mitad, en las concentraciones usadas según datos de Parpal *et al.* (2001), consiguen alterar el transporte de glucosa en los adipocitos, aumentándolo en condición basal (no estimulados por insulina). Esto podría responder al hecho de que estos tratamientos inhiban la vía de reciclaje de GLUT4 (Kandror and Pilch, 1996; Livingstone et al., 1996). También podría indicar que el transportador de glucosa GLUT4, que en condiciones de no estimulación permanece en un compartimento intracelular sensible a insulina, se dirige a la membrana plasmática sin que exista esta señal, de manera espontánea, igual que ocurre cuando se introduce en los adipocitos el dominio carboxi-terminal de GLUT4 (Lee and Jung, 1997), o cuando se introduce el dominio carboxi-terminal de la proteína IRAP (*insulin-responsive aminopeptidase*)(proteína que colocaliza con GLUT4 y participa en su translocación a la membrana plasmática en respuesta a insulina)(Waters et al., 1997) Se ha descrito, además, que la insulina provoca el desenmascaramiento de una región carboxi-terminal de GLUT4 (Smith et al., 1991; Wang et al., 1996).El hecho de que el tratamiento con CD y MCD aumente el transporte de glucosa basal quizá responda a algún efecto de las drogas empleadas, sobre la estructura y/o composición de las membranas de los compartimentos que contienen GLUT4, que permitan esta llegada espontánea de GLUT4 a la membrana plasmática.

En nuestros experimentos, ningún tratamiento modificó el transporte de glucosa estimulado por insulina, en contra de lo publicado por Gustavsson *et al.* (1999) y Parpal *et al.* (2001) que indican que el tratamiento con MCD 10mM disminuye 4 veces el transporte estimulado por insulina.

Cuando analizamos la activación de las vías de señalización de la insulina que llevan al incremento de la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática, observamos en la figura 3 de la sección Resultados, que la integridad de las caveolas no es necesaria para la correcta fosforilación de IR, lo cual coincide con lo publicado Parpal *et al.* (2001). Nuestros resultados muestran que tampoco se afecta la fosforilación de IRS-1 aunque sí disminuye la activación de Akt, en cambio Parpal et al. (2001), demostraban que esta fosforilación de IRS-1 disminuye en presencia de CD en adipocitos aislados de rata, y la de Akt es indetectable. Esta discordancia podría deberse a que en nuestros experimentos usamos una dosis más alta de insulina (100nM) que Parpal et al. (1nM), y que nosotros trabajamos con líneas de adipocitos 3T3L1 y no con adipocitos aislados de rata.

La fosforilación de c-Cbl en presencia de insulina también disminuye a la mitad, sólo en presencia del tratamiento con MCD. Este efecto puede deberse a que este compuesto sea más potente en la extracción de colesterol de las membranas, afectando en mayor medida a la composición de los *raft* lipídicos y por tanto, a las proteínas que dependen de ellos. No puede descartarse algún efecto inespecífico de esta droga sobre estas vías de señalización.

Como segundo objetivo en este apartado analizamos la importancia de la integridad de las caveolas/ *rafts* lipídicos sobre otros dos efectos que tiene la insulina sobre el metabolismo de los adipocitos: la inhibición de la lipólisis y la estimulación de la lipogénesis, y comprobar si estas acciones de la insulina pudieran depender de la vía de señalización de IR asociada a caveolas, ya que por un lado algunos autores han localizado a IR en caveolas en adipocitos 3T3L1 (Gustavsson *et al.*, 1999; Parpal *et al.*, 2001) y por otro lado, el enzima diana de la vía de señalización de la insulina que provoca la inhibición de la lipólisis, fosfodiesterasa 3P (PDE3P), también se ha localizado en *rafts* lipídicos/caveolas (Nilsson *et al.*, 2006).

Cuando analizamos la inhibición de la lipólisis por insulina (figura 4), observamos que aunque los tratamientos que alteran la estructura y composición de las caveolas (CD y MCD) aumentan la lipólisis basal y la estimulada por insulina, no parece que interfieran en la acción de la insulina inhibiendo la lipólisis, ya que los porcentajes de inhibición de la lipólisis permanecen similares a los de las células sin tratar. Cuando, para realizar este tipo de experimentos, añadimos a todas las condiciones adrenalina 1nM (figura 6), de nuevo se alteró ligeramente la lipólisis basal y/o la estimulada por insulina en los adipocitos bajo los distintos tratamientos respecto a las células control, pero de nuevo el porcentaje de inhibición de la lipólisis no varió. Estos tratamientos descolesterolizantes no se han usado para ensayos lipolíticos en la bibliografía, de forma que los efectos que tienen sobre la lipólisis podrían deberse realmente a su efecto sobre los *rafts* lipídicos, aunque también podrían deberse a algún efecto inespecífico sobre la regulación de la lipólisis, así por ejemplo las moléculas como los nitrosotioles (donantes de óxido nítrico en forma oxidada,  $\text{NO}^+$ ) se sabe que incrementan la lipólisis basal mediante S-nitrosilación de los grupos SH de las proteínas implicadas en la lipólisis, igual que lo hacen la N-etilmaleimida (agente alquilante de grupos tiol) (Giudicelli *et al.*, 1975; Gonzalez-Yanes and Sanchez-Margalet, 2006). Lo que sí parecen indicar los resultados de las figuras 4 y 6 es que la inhibición que provoca la insulina sobre la lipólisis no se ve afectada por la alteración de la estructura de las caveolas/ *rafts* lipídicos.

Al analizar la estimulación de la lipogénesis por insulina en los adipocitos sometidos a los distintos tratamientos descolesterolizantes, observamos en la figura 7, que sólo las drogas que alteran la estructura y la composición de las caveolas (CD y MCD) aumentan la lipogénesis basal 4 y 5 veces respectivamente, este aumento es independiente de la acción de la insulina y podría estar relacionado con el aumento del transporte de glucosa basal. CD y MCD, en cambio, disminuyen la lipogénesis estimulada por insulina, sin embargo este hecho puede responder a que estos tratamientos disminuyen la activación de la ATP-citrato liasa por la insulina (Gustavsson *et al.*, 1999) (enzima clave en la síntesis de acetil-CoA a partir de citrato, procedente fundamentalmente del ciclo de Krebs).

Los resultados indican que los tratamientos usados afectan a la lipólisis y a la lipogénesis celular de manera independiente al efecto que puedan tener sobre la señalización de la insulina.

## 2 Obtención de líneas 3T3L1 deficientes en caveolina-1 mediante silenciamiento génico posttranscripcional.

Como hemos explicado en la introducción, las caveolas son un subtipo de *raft* lipídico muy abundante en la membrana de los adipocitos, constituyendo hasta un 30% de la superficie de su membrana (Fan *et al.*, 1983). La característica fundamental que diferencia a las caveolas de cualquier otro tipo de *raft* lipídico es que presentan caveolina-1, de hecho, se forman a partir de los rafts por oligomerización de caveolina-1 o caveolina-3. Por esta razón decidimos alterar las caveolas de manera específica, mediante la eliminación de la caveolina-1, usando el silenciamiento génico posttranscripcional, *RNA interference*.

Cuando nos planteamos usar este tipo de herramienta, el único modelo de adipocitos deficientes de caveolina-1 procedía de los ratones KO generados en 2001 (Razani *et al.*, 2001a; Drab *et al.*, 2001) aunque las primeras descripciones fenotípicas del tejido adiposo en estos ratones no aparecieron hasta 2002 (Razani *et al.*, 2002a), donde se mostró que estos ratones presentaban menor cantidad de tejido adiposo y que sus adipocitos tenían menor diámetro y estaban peor diferenciados. Además, en este modelo se relacionó por primera vez caveolas y caveolina-1 con homeostasis lipídica y obesidad

El uso de *RNA interferente* para disminuir la expresión de caveolina-1 comenzó contemporáneamente con nuestros experimentos, así en 2004 se publicaron los dos primeros trabajos donde usaban moléculas de siRNA para silenciar la caveolina-1 (Hong *et al.*, 2004; Gonzalez *et al.*, 2004), aunque sólo el primero de ellos usaba como modelo celular los adipocitos 3T3L1. Además, estos autores Hong *et al.* (2004) emplearon una secuencia del siRNA para caveolina-1 idéntica a la nuestra. En este caso, como en el nuestro, también generaron líneas de preadipocitos 3T3L1 deficientes en caveolina-1, pero las obtuvieron mediante la selección de clones que expresaban de forma estable el vector que contenía la secuencia de siRNA. En nuestro caso, las líneas de preadipocitos 3T3L1 no proceden de un solo clon de células sino de una población de células transducidas con vectores lentivirales. Pretendíamos así generar un modelo fácilmente reproducible (mediante infecciones sucesivas) y altamente heterogéneo en las posiciones de integración del vector en el genoma, de manera que los efectos observados en los adipocitos resultantes pudieran ser atribuibles a la carencia de caveolina-1.

En el resto de publicaciones en las que usan *RNA interference* para disminuir la expresión de la caveolina-1 emplean como modelo celular otras líneas celulares: células endoteliales de aorta bovina (BAEC) (Gonzalez *et al.*, 2004; Lupu *et al.*, 2005), líneas de hepatocarcinoma murino (IAR-20, HcA-F), células procedentes de cáncer de pulmón (Sunaga *et al.*, 2004). En todas estas células, no generan líneas estables, sino que usan la transfección transitoria de las moléculas de doble cadena de RNA (siRNA) de la misma manera que hicimos nosotros para comprobar la eficiencia de las secuencias de siRNA diseñadas antes de clonaras en vectores lentivirales (apartado 2.1 de los resultados) en la línea estable de células HeLa que sobreexpresan caveolina-1.

Sólo en otras dos publicaciones usan sistemas víricos para introducir los siRNA en las células y provocar la disminución de la caveolina-1; lentivirus en células EV304 (*human vascular endothelial cells*) (Yang *et al.*, 2007), y retrovirus simples en células MDCK (Madin-Darby canine kidney) (Manninen *et al.*, 2005).

Nos planteamos el uso de los vectores víricos para introducir las secuencias que generan los siRNA que “silencian” la caveolina-1, debido a la dificultad que supone introducir material genético en los adipocitos 3T3L1 mediante transfección.

El uso de adenovirus para transducir material genético en adipocitos 3T3L1 estaba ampliamente establecido en el momento de iniciar estos experimentos, sin embargo en la mayoría de los casos se usaban los adenovirus para introducir las formas dominantes negativas de las proteínas cuya función se quería anular (Gnudi et al., 1997; Kao *et al.*, 1998; Ceresa *et al.*, 1998; Kanzaki et al., 2001b). Y sólo en dos publicaciones, posteriores al inicio de estos experimentos, se describe el uso de adenovirus para introducir moléculas de siRNA (Hosono et al., 2005; Yan et al., 2007).

En el momento de iniciar estos experimentos se había descrito que los adipocitos y preadipocitos 3T3L1 se podían transducir fácilmente usando vectores lentivirales derivados del HIV-1 sin que aparecieran signos de toxicidad o citopatogenicidad en los cultivos (Carlotti *et al.*, 2004). Además, el laboratorio del Dr. Didier Trono (Ecole Polytechnique Fédérale de Lausann, Suiza) había desarrollado las herramientas para conseguir de manera sencilla las construcciones necesarias para generar los siRNA usando estos vectores lentivirales. Estos vectores funcionaban eficientemente provocando el silenciamiento génico en numerosas líneas celulares y también en adipocitos 3T3L1 (Katayama *et al.*, 2004). En la actualidad, casas comerciales como Invitrogen o Ambion, han desarrollado nuevos vectores lentivirales con distintas características que se usan habitualmente para introducir el material genético que provoque *RNA interference* en las células, y de hecho se usan para el silenciamiento eficiente en preadipocitos 3T3L1 (Katayama *et al.*, 2004) y adipocitos 3T3L1 (Liao et al., 2006; Liao et al., 2007).

El título infectivo que obtuvimos (mediante el análisis por citometría de flujo de las células Hek293 que expresaban GFP) es semejante a lo publicado por estos autores, en torno a  $10^7$ - $10^8$  unidades infectivas/ml.

Como se describe en el apartado 2.2 de los resultados, con las multiplicidades infectivas empleadas (10, 50, 100, 300) no conseguimos un elevado porcentaje de infección de los adipocitos maduros ni tampoco disminuir la expresión de la caveolina-1. Sin embargo, las publicaciones del Dr. Olefsky et al. (Liao *et al.*, 2006; Liao *et al.*, 2007) muestran que son capaces de infectar adipocitos maduros y de silenciar eficientemente (la expresión de PPAR $\gamma$ ) usando una multiplicidad infectiva de aproximadamente 120. La única diferencia parece que es el vector derivado del HIV-1 donde se clona la secuencia del siRNA, que en este caso es el pLL3.7 y no pLVTH, aunque su estructura es altamente similar.

La generación de líneas de preadipocitos 3T3L1 deficientes en caveolina-1 respondió por un lado, a la incapacidad de transducir eficientemente los adipocitos maduros con los lentivirus-siRNA, y por otro lado a estudiar el proceso de diferenciación a adipocito maduro, y las consecuencias que tiene la carencia de caveolina-1 desde el estado predeterminado no diferenciado de esta línea celular. Sin embargo, sería interesante analizar el efecto de la disminución de caveolina-1 en los adipocitos maduros mediante la expresión transitoria de los siRNA mediante el uso de adenovirus u otros vectores lentivirales.

### 3 Estudio de las caveolas/rafts lipídicos en los adipocitos 3T3L1 deficientes en caveolina-1

#### 3.1 Análisis de la presencia de caveolas

La generación de fragmentos de membrana plasmática (*plasma membrane lawns*, PML) y la posterior obtención de sus réplicas mediante la técnica de *freeze-drying* para poder observarlas por microscopía electrónica, es una técnica idónea para la observación tridimensional de estructuras del interior de la membrana plasmática, como son las caveolas (Robinson *et al.*, 1992; Ros-Baro *et al.*, 2001; Calvo *et al.*, 2001; Fernandez *et al.*, 2002).

Por ello, cuando desarrollamos las líneas de adipocitos deficientes en caveolina-1 quisimos analizar la presencia o ausencia de caveolas y sus características, en la membrana de estos adipocitos. Comprobamos, mediante microscopía electrónica, que la disminución de la expresión de caveolina-1 conlleva una disminución importante en el número de caveolas. También pudimos observar que cuando detectábamos caveolina-1 en la membrana plasmática (por inmunolocalización usando oro coloidal), era frecuente, que esta caveolina-1 no formara parte de caveolas (prácticamente ausentes). En cambio, en los adipocitos control prácticamente la totalidad de caveolina-1 marcada aparece formando parte de las caveolas de membrana. Comprobamos además, que las pocas caveolas que existen, nunca forman los racimos/agrupaciones de caveolas, que son tan abundantes en las membranas de los adipocitos control.

Los adipocitos sicav1 expresan un 95% menos de caveolina-1 pero los resultados indican que la caveolina-1 que queda, llega a la membrana plasmática. Sin embargo, nuestros datos sugieren que es necesaria una cantidad mínima de caveolina-1 (cantidad umbral) para formar caveolas, de tal forma que el porcentaje de disminución del número de caveolas es proporcional a la disminución de caveolina-1. Estos resultados concuerdan con los de Pelkmans and Zerial (2005a) que afirman que caveolina-1 llega a las caveolas en cantidades discretas, de manera que la unidad mínima caveolar contiene aproximadamente 144 moléculas de caveolina-1. La cantidad de caveolina-1 es por tanto un factor crítico en la formación de caveolas de la misma manera que se ha descrito que para que ocurra la formación de las caveolas es necesario alcanzar un nivel mínimo en la cantidad de colesterol total de la célula (Hailstones *et al.*, 1998).

Dado que en la membrana de adipocitos sicav1 cuando aparecen caveolas, éstas nunca forman racimos sino que aparecen de manera individual, es posible que exista un segundo umbral en la cantidad de caveolina-1 para que las caveolas que se forman generen racimos.

La presencia de caveolas en los modelos de adipocitos deficientes en caveolina-1 publicados (Razani *et al.*, 2001b; Hong *et al.*, 2004), también la han analizado estos autores, mediante el análisis por microscopía electrónica de cortes ultrafinos de adipocitos generados por inclusión convencional y ultramicrotomía a temperatura ambiente, y sus resultados coinciden con los nuestros, en el caso de los ratones KO de caveolina-1 desaparecen las caveolas de la superficie de la membrana plasmática (Razani *et al.*, 2001b) mientras que los adipocitos 3T3L1 deficientes en caveolina-1 presentaban una disminución en el número de caveolas similar a la disminución de la expresión de caveolina-1 (Hong *et al.*, 2004).

### 3.2 Análisis de los *rafts* lipídicos en la membrana plasmática

Se han descrito diversos métodos bioquímicos para aislar *rafts* lipídicos a partir de tejidos o de cultivos celulares (Anderson, 1998) que se fundamentan en:

1. La flotación de membranas insolubles en detergente (Tritón-X-100) sobre gradientes de sacarosa (Sargiacomo *et al.*, 1993).
2. La flotación de membranas resuspendidas en tampón de pH elevado (carbonato pH11) (Song *et al.*, 1996).
3. La flotación de membranas plasmáticas sonicadas sobre gradientes OptiPrep (Smart *et al.*, 1995).
4. Centrifugación diferencial de homogenados de tejido (Chang *et al.*, 1994).
5. Recuperación por centrifugación en un gradiente de sacarosa (Schnitzer *et al.*, 1995) o por inmunoadsorción (Stan *et al.*, 1997) de membranas plasmáticas de células endoteliales purificadas por adsorción a una matriz catiónica de silica gel.

De todos estos métodos, los dos primeros son los más usados en la bibliografía, y como se explica en el apartado 3.2.1 de la sección Resultados, se basan en que los *rafts* lipídicos tienen una baja densidad de flotación y se separan fácilmente en las fracciones ligeras de los gradientes discontinuos de sacarosa.

Cuando analizamos la distribución del gangliósido GM1, esfingolípido característico de *rafts* lipídicos comprobamos que la carencia de caveolina-1 no afecta a su distribución en las fracciones ligeras.

La carencia de caveolina-1 tampoco afectó a la distribución de marcadores proteicos en la membrana de los adipocitos, analizada mediante los dos primeros métodos de aislamiento de *rafts* lipídicos.

Como se describe en el apartado 3.2.2 de la sección Resultados, la localización de los marcadores proteicos analizados, en ocasiones, ha creado controversia al analizarlos por estos métodos, y para asegurar la localización de una proteína determinada en *rafts* lipídicos /caveolas es necesario realizar otras pruebas bioquímicas, como la inmunoadsorción de las caveolas (las proteínas SSAO y CD36 se localizaron en caveolas por este método (Souto *et al.*, 2003)) o el aislamiento mecánico de caveolas (mediante este método, la Dra. Anna Ros Baró durante su tesis doctoral, localizó las proteínas GLUT1, SSAO y flotilina en caveolas); o mediante técnicas de microscopía electrónica y/o confocal (el receptor de insulina se localizó así en caveolas (Gustavsson *et al.*, 1999; Vainio *et al.*, 2002).

Así, la Dra. Anna Ros de nuestro laboratorio observó que GLUT4 se localizaba en las caveolas de adipocitos 3T3L1 y en los aislados de rata, mediante técnicas de microscopía electrónica (Ros-Baro *et al.*, 2001), otros autores como Karlsson *et al.* (2002) corroboraron estos resultados. Aunque otros autores han descrito un modelo en que proteínas como GLUT4 se distribuyen entre regiones de la membrana plasmática desprovistas de caveolina y en la periferia de grandes dominios de la membrana que sí contienen caveolina (Shigematsu *et al.*, 2003). Estos grandes dominios de la membrana plasmática fueron inicialmente descritos por Parton *et al.* (2002) y los llamó *caves* (cavernas). Estos *caves* son especializaciones de la membrana plasmática presentes en adipocitos diferenciados que contienen caveolas, vesículas recubiertas de clatrina, marcadores de superficie celular y citoesqueleto de actina. Algunos autores, Parton *et al.* (2002); Shigematsu *et al.* (2003), proponen que algunas proteínas, como GLUT4, no se asocian directamente a caveolas sino que se localizan en estos macrodominios de la membrana plasmática en posible equilibrio entre sus distintos componentes.

Es, por tanto, difícil afirmar cuando una proteína pertenece a caveolas/*rafts* lipídicos y es necesaria la comprobación por diversas técnicas bioquímicas y de microscopía para confirmar la asociación con caveolas.

Así, mediante las pruebas realizadas en el apartado 3.2.2 no podemos afirmar que marcadores se encuentran en los *rafts* lipídicos con seguridad, harían falta más pruebas para confirmarlo. Pero sí indican, que la carencia de caveolina-1 no afecta a la distribución de los marcadores proteicos (que en la bibliografía se ha descrito que están asociados a caveolas) a lo largo del fraccionamiento celular, de tal manera que proteínas que se encuentran en fracciones ligeras mediante alguno de los dos métodos de extracción, lo están tanto en presencia como en ausencia de caveolina-1.

## 4 Análisis de la diferenciación a adipocitos de los preadipocitos 3T3L1 deficientes en caveolina-1

### 4.1 Características morfológicas y contenido lipídico de los adipocitos

Como se ha expuesto en el apartado 3.1 de la sección Introducción, durante el proceso de diferenciación se activan una serie de factores de transcripción primarios (c/EBP $\beta$  y PPAR $\gamma$ ) que llevan a la activación de otros factores de transcripción (c/EBP $\alpha$ , ADD1/SREBP-1c), de tal manera que finalmente, en conjunto, llevan a activar la expresión de proteínas características de los adipocitos (GLUT4, receptor de insulina, SSAO...), muchas de las cuales están implicadas en las acumulación de lípidos y en su metabolismo lipídico (FATP1, CD36, LPL, HSL, perilipina, aP2...)

Como se muestra en el apartado 4.1 de la sección Resultados, los preadipocitos 3T3L1 con una marcada disminución de la expresión de caveolina-1 diferencian normalmente a adipocito, en lo que respecta a su morfología y la de sus gotas lipídicas (LDs), y a la cantidad de triacilglicéridos y colesterol total, acumulados en la célula.

Estos resultados coinciden con los publicados por (Hong *et al.*, 2004), que mostraban que tanto el crecimiento durante la diferenciación, como la morfología y acumulación de LDs de los adipocitos (teñidos mediante tinción *oil red O*) no se modificaba por la ausencia de caveolina-1 en los adipocitos 3T3L1. En cambio, los ratones KO de caveolina-1 (*cav1<sup>-/-</sup>*) se ha descrito que presentan menor peso corporal que sus controles silvestres, y que esta diferencia de peso se debe a la reducción de los depósitos de tejido adiposo. Comprobaron que los adipocitos son de menor tamaño y con menos LDs (Razani *et al.*, 2002a). Sin embargo, estas diferencias comienzan a encontrarse a partir de 4 semanas de edad y se acentúan cuando los ratones tienen 36 semanas. Además, estos ratones tienen otros problemas vasculares y pulmonares (Razani *et al.*, 2001a), y metabólicos, como resistencia a la aparición de obesidad inducida por la dieta rica en lípidos y tienen altos niveles de TAG y ácidos grasos en la sangre, de tal manera que quizá el efecto de la carencia de caveolina-1 sobre la diferenciación de los adipocitos sea indirecta.

En lo que respecta al contenido de colesterol de los adipocitos, la disminución de caveolina-1 no afectó los niveles de colesterol total. Existen muchos datos sobre la relación entre la caveolina-1 y el colesterol.

Por un lado, como ya se ha descrito, las caveolas tienen una composición diferente al resto de la membrana siendo especialmente ricas en colesterol. Además, la caveolina-1 se une directamente al colesterol libre en una estequiometría 1:1 o 1:2. La expresión de la caveolina-1 está regulada a nivel transcripcional por los niveles de colesterol libre en el retículo endoplasmático a través de elementos de regulación del promotor por esteroides (*sterol-responsive promoter elements*, SRPE), de tal forma que altos niveles de colesterol libre inducen un aumento de la transcripción de caveolina-1 (Hailstones *et al.*, 1998; Fra *et al.*, 2000). Además, los niveles de la proteína caveolina-1 (Fielding *et al.*, 1999) y el tráfico de

caveolina-1 a través del complejo de Golgi y entre la superficie celular y los LDs también responden a cambios en los niveles de colesterol (Pol *et al.*, 2005).

Sin embargo, son los estudios usando mutantes de caveolina los que más han apoyado un papel de la caveolina-1 regulando los niveles de colesterol. Así, el mutante Cav3<sup>DGV</sup> (y su equivalente Cav1<sup>DGV</sup>) provoca una disminución del colesterol libre en las membranas y un aumento en endosomas tardíos, alterando la estructura de los rafts lipídicos de la membrana plasmática e inhibiendo algunas vías de señalización mediadas por la isoforma H-Ras palmitoilada (Roy *et al.*, 1999). El mutante puntual Cav3<sup>C71W</sup> (asociado a distrofia muscular), también altera específicamente la señalización de Ras de la misma manera (Lau *et al.*, 2004). En ambos casos la inhibición de la señalización se rescataba al añadir colesterol o sobreexpresar caveolina-1 o 3. Sin embargo, mientras que el mutante Cav3<sup>DGV</sup> se acumula en LDs y afecta a la distribución de los lípidos neutros, Cav3<sup>C71W</sup> llega a la membrana plasmática y no afecta a esta distribución.

Se ha descrito que las células MEF (*mouse embryonic fibroblast*) y MPM (*mouse peritoneal macrophages*) de ratones KO de caveolina-1 apenas presentan colesterol libre en los extractos celulares, sin embargo, los niveles de colesterol esterificado se encuentran aumentados (Frank *et al.*, 2006). Estas células presentan una menor síntesis de colesterol libre, pero tienen aumentada la actividad acil-CoA colesterol acil transferasa (ACAT). Estos autores observaron que la tasa de salida del colesterol desde las células MEFs y MPMs a las HDLs no variaba en los ratones KO de caveolina-1. Estos resultados concuerdan con los trabajos publicados por Drab *et al.* (2001) y Razani *et al.* (2002a) en los ratones KO de caveolina-1 que secretan niveles normales de colesterol libre torrente sanguíneo o los de Ikonen *et al.* (2004) en líneas celulares sin caveolina-1, que presentan niveles normales de secreción de colesterol.

Aunque hay estudios que apoyan un papel de la caveolina-1 facilitando el transporte de colesterol, puede que ésta no sea esencial para el transporte de colesterol libre en todos los tipos celulares pero que puede aportar; una ruta de transporte especializada, o un mayor nivel de regulación del transporte en respuesta a señales específicas (Martin *et al.*, 2005).

## 4.2 Marcadores proteicos de diferenciación

### 4.2.1 Análisis molecular del proceso de diferenciación

Como se ha explicado en el apartado 3.1 de la sección Introducción, durante el proceso de diferenciación adipocitaria son fundamentales dos eventos, en el momento de la estimulación hormonal tras la inhibición del crecimiento por contacto celular (el proceso de diferenciación de la línea 3T3L1 está descrito en el apartado 1.8 de la sección Materiales y Métodos y brevemente en el apartado 4 de la sección Resultados):

- La expansión clonal (reentrada en el ciclo celular). En este momento es especialmente importante la acción que la insulina ejerce activando al receptor de IGF-1 (*insulin-like growth factor receptor*), que lleva a la activación de una cascada de señalización (que involucra a ERK1 y ERK2 y a Akt) que provoca, por un lado la reentrada en el ciclo celular y por otro la activación del programa de diferenciación (Mackall *et al.*, 1976; Rosen *et al.*, 1979; Student *et al.*, 1980; Smith *et al.*, 1988; Gregoire *et al.*, 1998; Jin *et al.*, 2000).

- La activación de toda una cascada de factores de transcripción que finalmente lleva a la expresión de genes característicos de adipocitos. En esta cascada hay dos familias de factores de transcripción fundamentales: los CCAAT/*enhancer binding proteins* (c/EBPs) y los *peroxisome proliferator-activated receptors* (PPARs). (Wu *et al.*, 1995; Rosen *et al.*, 2000a; Prusty *et al.*, 2002; Fajas, 2003; Tzameli *et al.*, 2004; Farmer, 2005). Brevemente, los primeros factores de transcripción que se inducen son c/EBP $\beta$  y c/EBP $\delta$ . c/EBP $\beta$  activa, por un

lado, la expresión de PPAR $\gamma$  y por otro la síntesis de ligandos de PPAR $\gamma$ , PPAR $\gamma$  a su vez también activa la expresión de c/EBP $\alpha$ . Estos tres factores de transcripción activan a otros factores de transcripción (como ADD1/SREBP1) que en conjunto provocan la expresión de genes característicos de adipocitos.

Los trabajos realizados en líneas celulares 3T3L1 con un marcada disminución de la expresión de caveolina-1 mediante el uso de siRNA, analizan la expansión clonal del proceso de diferenciación adipocitaria, estudiando la activación y posterior señalización del receptor de IGF-1 (Huo et al., 2003; Hong et al., 2004). Estos estudios concluyeron que para la activación y posterior señalización de este receptor es necesaria la presencia de *rafts* lipídicos, pero no de caveolas.

Estos resultados se complementan con los nuestros (apartado 4.2.1 de la sección Resultados) en los que analizamos la expresión de tres de los factores de transcripción fundamentales en la expresión de genes característicos de adipocitos maduros: PPAR $\gamma$ , c/EBP $\alpha$  y c/EBP $\beta$ . y comprobamos que, efectivamente, la carencia de caveolina-1 no afecta a la expresión de estos factores de transcripción durante la diferenciación de los preadipocitos 3T3L1.

En lo que respecta al papel de la caveolina-1 en otros procesos de diferenciación adipogénicos, se ha descrito que la sobreexpresión de caveolina-1 en hMSC jóvenes (*human Mesenchymal stem cells*) suprime no sólo la señalización de insulina sino también la diferenciación adipogénica, sin afectar la expresión de PPAR $\gamma$ 2. (Park et al., 2005). Estos autores concluyen que la pérdida del potencial de diferenciación de las células hMSC senescentes está mediada por un aumento en la expresión de caveolina-1.

#### 4.2.2 Expresión de marcadores proteicos de adipocitos maduros

Una vez analizado el patrón de expresión de algunas proteínas cuya expresión se induce durante la adipogénesis y que son, por tanto, marcadores de adipocitos maduros (apartado 4.2.2 de la sección Resultados) observamos que la deficiencia en caveolina-1 no afectó a la expresión de la mayoría de estos marcadores. Únicamente la expresión de IR, de GLUT4 y de caveolina-2 se vio disminuida aproximadamente a la mitad. Podemos decir, por tanto, que la disminución en la expresión de estas proteínas no responde a una peor diferenciación (según lo estudiado durante el apartado 4 de la sección Resultados). Además, cuando analizamos la cantidad de mRNA mediante PCR a tiempo real de estas proteínas, no había diferencias entre los adipocitos control (*scramble*) y los sicav1. Por tanto, el efecto que tiene la deficiencia de caveolina-1 sobre estos marcadores se realiza sobre la proteína (bien, alterando la síntesis, o su degradación y vida media), no sobre la expresión de los genes.

La disminución en la expresión de caveolina-2 ya se ha descrito en el tejido adiposo de ratones KO de caveolina-1 (Drab et al., 2001; Razani et al., 2001a) y en los adipocitos 3T3L1 deficientes en caveolina-1 generados también mediante *RNA interference* (Hong et al., 2004), y responde a que la estabilidad y la llegada a la membrana plasmática de caveolina-2 depende de la presencia de caveolina-1 de tal manera que cuando no se expresa, caveolina-2 se degrada antes de alcanzar la membrana (Parton, 1996; Okamoto et al., 1998; Parolini et al., 1999; Mora et al., 1999).

También se ha descrito una disminución de la proteína de IR en los adipocitos de los ratones KO de caveolina-1 generados por Razani et al. (2001a) y Drab et al. (2001) independientemente. Así Cohen et al. (2003b) describió una disminución del 90% en la expresión de IR en los adipocitos de estos ratones (no así, en músculo, ni en hígado) sin que

se afectaran los niveles de mRNA, sugiriendo un papel estabilizador de la caveolina-1 sobre IR. Estos resultados concuerdan con los nuestros, aunque en nuestro modelo celular, la disminución de la expresión de IR no es tan marcada, si bien, es cierto que en nuestras células aún se expresa una pequeña cantidad de caveolina-1 (5%) que pudiera estabilizar parte de la proteína de IR. Además, se ha de tener en cuenta, que los ratones *cav1*<sup>-/-</sup> muestran hiperinsulinemia, y esta reducción tan importante de la cantidad de IR también puede deberse a que los mayores niveles de insulina circulantes a los que están sometidos los adipocitos afecten a la cantidad de IR, ya que se ha descrito que la incubación prolongada con insulina provoca la rápida internalización de IR que puede quedar secuestrado en el interior celular (Krupp and Lane, 1981), ser reciclado a la membrana plasmática, o bien ser degradado (Green and Olefsky, 1982; Ronnett et al., 1982; Heidenreich et al., 1983; Grako et al., 1992).

Cohen et al. (2003b) muestran que los adipocitos de los ratones *cav1*<sup>-/-</sup> presentan una sobreexpresión de GLUT4, justo al contrario de lo que nosotros observamos en nuestro modelo celular. Aunque este resultado puede deberse a la hiperinsulinemia a la que está sometido el tejido adiposo, ya que algunos autores muestra que la expresión de GLUT4 se encuentra disminuida en estados de deficiencia de insulina (ratones diabéticos por tratamiento con streptozotocina) y que este efecto se revierte tras el tratamiento con insulina durante un periodo largo (48 horas)(Olson et al., 1993; Gerrits et al., 1993; Olson and Pessin, 1995; Charron et al., 1999; Yu et al., 2001). Además, se ha demostrado que la incubación durante 18-48 horas con insulina tienen un efecto estimulador de la expresión génica de GLUT4 en células 3T3-F442A sólo cuando se encuentran en un medio bajo en glucosa (Yu et al., 2001). Sin embargo, otros autores describen que el tratamiento con insulina durante 6 horas reprime la expresión de GLUT4 en adipocitos 3T3L1 gracias a un elemento de respuesta a insulina localizado entre los nucleótidos 706-676 de la secuencia 5' del gen (Cooke and Lane, 1999a; Cooke and Lane, 1999b). Autores como Flores-Riveros et al. (1993); Ezaki et al. (1993); Cooke and Lane, (1999a); Cooke and Lane (1999b) también describen que la incubación con insulina de adipocitos 3T3L1 durante 6-8 horas actúa sobre el promotor de GLUT4 inhibiendo su expresión.

En los ratones KO para el receptor de estrógenos alpha (*Er $\alpha$*  <sup>-/-</sup>) aparece una caída importante de GLUT4 en la membrana de las células musculares que se corresponde también con una bajada en la expresión de caveolina-1(Barros et al., 2006), sin embargo, la disminución de la proteína viene determinada por una disminución también en el mRNA, no estamos por tanto en las condiciones de nuestros experimentos.

#### **4.3 Análisis de la estabilidad/vida media de las proteínas: receptor de insulina (IR) y GLUT4.**

Se ha descrito ampliamente en la bibliografía que la unión de la insulina a su receptor en la membrana plasmática estimula la actividad tirosina-quinasa de IR y además estimula la internalización del complejo ligando-receptor hacia compartimentos endosomales, donde la insulina se separa de su receptor para ser degradada, mientras que IR se recicla para dirigirse de nuevo a la membrana plasmática mediante una vía endosomal, o bien, es degradado (Heidenreich *et al.*, 1983; Heidenreich et al., 1984; Bevan et al., 1997; Bevan et al., 2000). IR contiene un motivo de internalización, que consiste en una tirosina (Tyr 960) cercana a la región de membrana en el contexto de la secuencia NPXT, que se encuentra también en otros receptores con actividad tirosina quinasa que se internalizan de manera dependiente de ligando mediante vesículas recubiertas de clatrina (Backer et al., 1990; Chen et al., 1990; Paccaud et al., 1993). Se ha descrito que la principal vía de internalización de IR es mediante

vesículas de clatrina (Bergeron et al., 1985; Backer *et al.*, 1990; Carpentier, 1992), aunque se ha sugerido que las caveolas también podrían participar en este proceso de endocitosis (Smith et al., 1998).

Se ha descrito que la vida media de IR en los adipocitos 3T3L1 en estado basal, es de 6-7 horas (Lane et al., 1981; Reed et al., 1981; Ronnett *et al.*, 1982) mediante la técnica de *heavy-isotope density shift*. Esto concuerda con nuestros resultados usando la técnica de pulso y caza usando metionina marcada con [<sup>35</sup>S], sin embargo, la vida media de IR en los adipocitos sicav1 disminuyó a 2,7 horas, lo cual está de acuerdo con los resultados obtenidos por (Cohen *et al.*, 2003b). Estos autores muestran que en los adipocitos de ratones cav1<sup>-/-</sup>, IR se degrada más rápidamente que en los ratones *wt* y esta degradación ocurre vía proteosoma.

En el caso de la proteína GLUT4, se ha descrito que su vida media en adipocitos 3T3L1 es aproximadamente 40-50 horas y su degradación es fundamentalmente vía proteosoma (Sargeant and Paquet, 1993; Liu et al., 2007). En nuestros experimentos, la vida media de GLUT4 en los adipocitos *scramble* es de 36 horas, sin embargo, de nuevo, en los adipocitos sicav1 la vida media disminuyó a 22 horas. Algunos autores han descrito en adipocitos 3T31 que GLUT4 interacciona con el enzima que conjuga proteínas SUMO Ubc9, y forma un complejo con la proteína SUMO1 que la estabiliza, de tal forma que la sobreexpresión de Ubc9 inhibe la degradación de GLUT4 y promueve su direccionamiento hacia los compartimentos GSC (*GLUT4 storage compartments*) mientras que la disminución de la expresión de Ubc9 aumenta la degradación de GLUT4 (Lalioi et al., 2002; Liu *et al.*, 2007).

Aunque se ha descrito ampliamente los mecanismos que participan en el reciclaje de GLUT4 durante la reversión de la acción de la insulina (revisiones Dugani *et al.*, 2005; Ishiki *et al.*, 2005; Larance et al., 2007), existen menos datos sobre la internalización de GLUT4 en estado basal. Existen autores que afirman que estos mecanismos de internalización y reciclaje de GLUT4 son diferentes en estado basal y durante la reversión de la acción de la insulina (Powell et al., 1999).

Los resultados indican que caveolina-1 juega un papel estabilizador de las proteínas IR y GLUT4 en los adipocitos. Sin embargo, aún queda analizar cuál es el mecanismo por el que se degradan estas proteínas en los adipocitos 3T3L1 (ubiquitinización, sumoilización, degradación vía lisosomas...) y si estos mecanismos varían en ausencia de caveolina-1. Sería interesante analizar si, aunque la deficiencia de caveolas/caveolina-1 no afecta a la endocitosis de GLUT4 (no hemos analizado aún su papel en la endocitosis de IR), caveolina-1 podría definir un compartimento intracelular, que tras la endocitosis de GLUT4 o IR, determinara el reciclaje eficiente de estas proteínas a la superficie celular, de tal manera que en su ausencia, se favoreciera la degradación de GLUT4 e IR. Así, los autores Pelkmans *et al.* (2004) afirman que tras la endocitosis vía *rafts* lipídicos, caveolina-1 podría actuar como elemento estabilizador de tal manera que dirige el tráfico hacia endosomas tempranos o hacia otras membranas del tráfico endocítico en función de la molécula endocitada.

## 5 Importancia de la caveolina-1 en la señalización de insulina

Una de las funciones más estudiadas de las caveolas ha sido su implicación en mecanismos de transducción de señales (Okamoto *et al.*, 1998).

Numerosos trabajos han aportado evidencias de que caveolina-1 puede interactuar directamente con muchas de las moléculas de transducción de señales, como las proteínas tirosina quinasa de la familia Src, Receptores G-coupled, miembros de la cascada Ras/MAPK o sintasa de óxido nítrico, localizadas en caveolas, mediante un dominio hidrofóbico conservado de 20 aminoácidos llamado dominio *scaffolding* (CSD; residuos 82-101 de la caveolina) (Couet *et al.*, 1997a). Aunque caveolina-1, y en concreto su dominio *scaffolding*, actúa en muchos casos como un regulador negativo de la señalización (Li *et al.*, 1995a; Song *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1996b), en otros casos, puede tener también un efecto activador en la transducción de la señal (Czarny *et al.*, 1999), como ha sido descrito en la señalización de la insulina (Yamamoto *et al.*, 1998; Cohen *et al.*, 2003a).

La relación que existe entre IR y caveolina-1/caveola ha sido ampliamente estudiada. En primer lugar, la localización de IR en caveolas ha sido motivo de gran controversia. Los resultados publicados por Mastick *et al.* (1995) demostraban que sólo el 2% del total de IR fosforilado se recupera en la fracción insoluble en Tritón-X-100. Muller *et al.* (2001) igualmente demostró que la mayor parte de IR se detecta en fracciones no caveolares cuando se realiza la extracción con detergente Tritón-X-100 y la centrifugación en un gradiente de sacarosa. Posteriormente, Souto *et al.* (2003) no detectaron la presencia de IR en las vesículas inmunoaisladas (usando un anticuerpo anti-caveolina). Sin embargo, el porcentaje de recuperación de estas vesículas enriquecidas en caveolina-1 es muy bajo (<10%) y tampoco se puede descartar el hecho de que las vesículas analizadas no sean caveolas de membrana ya que para la inmunoadsorción se partía de una fracción de microsomas ligeros.

En contraposición a estos resultados, los trabajos del grupo del Dr. Stralfors demostraron que IR se localiza en caveolas por métodos bioquímicos (extracción sin detergentes a pH 11) y mediante la observación de criosecciones de adipocitos 3T3L1 por microscopía electrónica (Gustavsson *et al.*, 1999). Estos autores además sugieren que no todas las proteínas asociadas a caveolas, como IR, son resistentes a la extracción con detergentes (Parpal *et al.*, 2001). Además, algunos autores (Gustavsson *et al.*, 1999; Parpal *et al.*, 2001; Cohen *et al.*, 2003a) afirman que la localización de IR en las caveolas/*rafts* lipídicos es clave para la acción de la insulina, en cambio, la localización del receptor en vesículas recubiertas de clatrina permite su internalización y posterior degradación a nivel de lisosomas (McClain and Olefsky, 1988).

En segundo lugar, la interacción entre IR y caveolina-1 fue sugerida en primer lugar por Couet *et al.* (1997a) que observó que la subunidad  $\beta$  de IR contiene un dominio de unión a caveolina ( $^{1193}\text{WSFGVVLW}^{1200}$ ). Posteriormente Yamamoto *et al.* (1998) mostraron que el dominio SCD de caveolina-1 (y caveolina-3) puede activar directamente la actividad quinasa de IR y permite la localización del receptor en las caveolas. Nystrom *et al.* (1999) mostraron la coimmunoprecipitación de caveolina-1 y de IR, que no ocurría cuando usaban mutantes de dominio CSD de caveolina-1. Se ha de tener en cuenta sin embargo, que todos estos resultados de interacción se han llevado a cabo usando sobreexpresión de las proteínas o los dominios implicados en células Hek293 o cos-7, y que por tanto, no son los modelos idóneos. En nuestro grupo hemos intentado coimmunoprecipitar IR y caveolina-1 endógenos usando extractos proteicos de adipocitos 3T3L1 y no hemos conseguido ver la interacción de estas proteínas mediante esta técnica.

## 5.1 Activación de las vías de señalización de la insulina y estimulación del transporte de glucosa

A las caveolas/ *rafts* lipídicos se les ha asignado un papel en la regulación de la homeostasis de glucosa en los adipocitos (Gustavsson *et al.*, 1996; Bryant *et al.*, 2002; Cohen *et al.*, 2003a).

La translocación del transportador de glucosa GLUT4 a la membrana plasmática por acción de la insulina implica la activación de dos vías de señalización: la vía de señalización dependiente de PI3K y una nueva vía independiente, que fue descrita en el año 2000 por grupos de los doctores A. Saltiel y J. Pessin, que se asociaba a caveolas y que denominamos c-Cbl/TC10 (Baumann *et al.*, 2000; Chiang *et al.*, 2001; Saltiel *et al.*, 2003). Estas vías se explican en el apartado 3.2.1.3 de la sección Introducción. Brevemente, en la primera vía la activación de IR provoca la fosforilación de IRS-1 que entonces activa a PI3K, generando así los derivados fosfoinositídicos (PI3P) que activan a PDK-1 y a Akt (PKB). La activación de estas proteínas y de otras de la cascada (PKC $\zeta$ , p70 S6 quinasa). En la segunda vía, la insulina estimula la fosforilación de c-Cbl para ello previamente requiere su translocación a *rafts* lipídicos/caveolas (donde intervienen las proteínas flotilina, CAP (c-Cbl associated protein) y APS). En estos dominios de la membrana c-Cbl activa a C3G (que es un *guanine nucleotide exchange factor*, GEF) que activa a la GTPasa TC10, necesaria para la remodelación del citoesqueleto de actina cortical implicada en la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática (Omata *et al.*, 2000; Kanzaki and Pessin, 2001b; Kanzaki *et al.*, 2002).

Estos autores confirmaban la importancia de esta segunda vía asociada a caveolas/*rafts* lipídicos mediante la sobreexpresión en los adipocitos 3T3L1 de dominantes negativos, claves en esta vía, como el dominante negativo CAP $\Delta$ SH3 (Baumann *et al.*, 2000). El dominio SH3 de la proteína CAP (c-Cbl associated protein) es fundamental para la interacción de c-Cbl con flotilina y su llegada a las caveolas (Baumann *et al.*, 2000), de tal manera que la sobreexpresión de este dominante negativo provocaba que en presencia de insulina la proteína sustrato de IR, c-Cbl, no se fosforilase en las caveolas, además de una inhibición importante de la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática y del transporte de glucosa. El dominante negativo TC10/T31N, es un mutante del *small GTP-binding protein* TC10, que permanece permanentemente inactivo (Chiang *et al.*, 2001). La sobreexpresión de este dominante negativo en los adipocitos 3T3L1 provoca, como antes, una importante inhibición de la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática y del transporte de glucosa estimulado por insulina.

Sin embargo, la importancia de esta vía en la acción de la insulina sobre la estimulación del transporte de glucosa está siendo motivo de discusión. Así, estudios realizados por Mitra *et al.* (2004), mediante el uso de siRNA para bloquear la expresión en adipocitos 3T3L1, de componentes claves de la vía Cbl/TC10, encontraron que los siRNA contra las proteínas CAP, c-Cbl, o CrKII (intercambiador de nucleótidos de TC10) no afectaban la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática ni al transporte de glucosa estimulados por insulina. Incluso los adipocitos epididimales procedentes de los ratones KO de c-Cbl, tampoco mostraban ninguna alteración en el transporte de glucosa estimulado por distintas dosis de insulina. Aunque, recientemente, los autores Chang *et al.* (2007) afirman que la proteína TC10 $\alpha$  (pero no la isoforma  $\beta$ ) es necesaria para la estimulación del transporte de glucosa por insulina, mediante el uso de RNA interference.

Otros estudios, con ratones KO de APS, proteína adaptadora que se asocia a IR, es fosforilada por él, permitiendo que el complejo flotilina-CAP-Cbl se reclute en caveolas y Cbl sea activado por IR (Baumann *et al.*, 2000). Minami *et al.* (2003) demostraron que en los adipocitos de estos ratones aumenta el transporte de glucosa estimulado por insulina. Además,

estudios con el dominante negativo de APS (Y618P) incapaz de interactuar con IR, efectivamente provoca la menor activación de Cbl por insulina, pero esto no afecta ni la translocación de GLUT4, ni al transporte de glucosa (Minami *et al.*, 2003).

Los autores Zhou *et al.* (2004), mediante el uso de silenciamiento génico con siRNA, estudiaron distintos componentes de las distintas rutas de señalización de la insulina descritas que llevan a la translocación de GLUT4 a la membrana y concluyeron que sólo la vía dependiente de PI3K es necesaria para la regulación de la translocación de GLUT4 por insulina.

En los experimentos que se muestran en el apartado 5.1 y 5.2 de la sección Resultados, observamos que la carencia de caveolina-1 de los adipocitos 3T3L1, no afecta a la fosforilación y activación de los componentes de estas vías de señalización que analizamos. Sólo observamos una diferencia, en la fosforilación de IR, pero esta disminución era debida a la menor expresión de IR en estas células, y no a una menor activación de su fosforilación. Aunque quedaría por analizar algún componente tardío de la vía c/Cbl/TC10 para comprobar que la caveolina-1 no afecta, en efecto, a esta vía de señalización. En nuestro grupo intentamos evaluar el estado de activación de TC10 en adipocitos 3T3L1, analizando su interacción con un efector de TC10 inmovilizado, Pak1 (*p21-activated kinase*) que contiene un dominio de unión a p21 (PBD) que interactúa directamente con TC10 (Neudauer *et al.*, 1998), mediante un ensayo de *pull down* usando GST-Pak1 (cedido por el Dr. Saltiel). Sin embargo, no conseguíamos recuperar suficiente cantidad de TC10 activo para identificarlo por western blot. Es posible que sea necesaria la sobreexpresión de TC10 en los adipocitos para estudiar la activación de TC10 mediante esta técnica, como realizan los autores (Chiang *et al.*, 2006).

Cuando analizamos el transporte de glucosa en estas células deficientes en caveolina-1 comprobamos que se veía disminuido a la mitad, aunque este efecto, es probable que se deba a la menor expresión de GLUT4 en estas células más que a un defecto en la señalización de la insulina. De hecho, cuando miramos la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática, ésta ocurre eficientemente en presencia de insulina, y de nuevo las diferencias con las células control se deben a una menor expresión de la proteína.

Los adipocitos deficientes en caveolina-1 presentan menor sensibilidad a la insulina estimulando el transporte de glucosa que los adipocitos control. Esta diferencia podría explicarse por la menor cantidad de IR que aparece en estos adipocitos. Sería interesante comprobar como quedaría la activación de los distintos componentes de la vía de señalización de la insulina analizados en la figura 40 si usásemos una concentración de insulina cercana a la EC50, para ver si en estas condiciones los adipocitos sicav1, que expresan menos receptor de insulina, muestran también menor activación en otros componentes más tardíos de la ruta cuya expresión no está alterada.

## **5.2 Papel de la caveolina-1/caveolas en la internalización de GLUT4 durante la reversión de la acción de la insulina.**

Como hemos visto, la insulina provoca un aumento en la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática y por tanto un incremento en el transporte de glucosa (Watson *et al.*, 2004; Dugani *et al.*, 2005). Este efecto se consigue fundamentalmente mediante un aumento de la exocitosis de GLUT4 y una disminución en su endocitosis desde la membrana plasmática (Bryant *et al.*, 2002; Govers *et al.*, 2004; Karylowski *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2006). Cuando eliminamos la insulina del medio, los adipocitos vuelven a su estado basal, durante la reversión

de la insulina, y para ello ocurre la endocitosis de GLUT4 desde la membrana plasmática hacia los compartimentos intracelulares.

Hay algunos estudios que indican que la internalización de GLUT4 ocurre mediante endocitosis mediada por vesículas recubiertas de clatrina (Robinson *et al.*, 1992; Nishimura *et al.*, 1993; Kao *et al.*, 1998; Volchuk *et al.*, 1998; Al Hasani *et al.*, 1998), mientras que otros autores apoyan la existencia de otra vía de endocitosis independiente de la clatrina, mediada por *rafts* lipídicos/caveolas (Ros-Baro *et al.*, 2001; Shigematsu *et al.*, 2003; Blot *et al.*, 2006).

La Dra. Anna Ros de nuestro laboratorio demostró que, nistatina y filipina (drogas que desestructuran los *rafts* lipídicos/caveolas) bloquean de manera específica la endocitosis dependiente de caveolas en adipocitos, ya que inhiben al endocitosis de la cadena B de la toxina colérica (CTB), la cual se ha descrito que en adipocitos se internaliza vía *raft* lipídico/caveola después de unirse al gangliósido GM1 (Holmgren *et al.*, 1973; Lencer *et al.*, 1999), sin afectar la endocitosis mediada por vesículas recubiertas de clatrina, ya que no afectan a la internalización del receptor de transferrina ni a la de insulina. En estas condiciones, la Dra. Anna Ros encontró que estos tratamientos inhibían la endocitosis de GLUT4 durante la reversión de la acción de la insulina en un 40%, y describió que, en este proceso de endocitosis de GLUT4, también participan las vesículas de clatrina, aunque estas vesículas eran responsables del 20% de la internalización. Estos resultados están de acuerdo con lo publicado por Parpal *et al.* (2001) y Shigematsu *et al.* (2003).

Además los resultados del Dr. McGraw, usando también nistatina para inhibir la endocitosis mediada por *rafts* lipídicos/caveolas, y un siRNA contra el adaptador de clatrina AP-2, que inhibe la endocitosis mediada por clatrina, muestran que la mayor parte (el 80%) de la endocitosis de GLUT4 en condiciones de no estimulación por insulina ocurre mediante la vía dependiente de caveolas/ *rafts* lipídicos en adipocitos 3T3L1 (Blot *et al.*, 2006).

En cambio, otros autores como Shigematsu *et al.* (2003) le dan un papel más importante a la endocitosis mediada por clatrina (en torno al 50-60%) y además indican la posible existencia de un tercer mecanismo de endocitosis distinto de estos dos, que también ha sido sugerido por otros autores (Conner *et al.*, 2003). Estos autores, además, no usan nistatina ni filipina para inhibir la endocitosis mediada por *rafts* lipídicos /caveolas, sino que usan un dominante negativo de la caveolina-1 (Cav1/S80E) que provoca en la retención intracelular de la caveolina-1 (y el co-secuestro de la caveolina-2) de tal manera que no llegan a la superficie celular y según lo descrito no forman caveolas (Parolini *et al.*, 1999; Schlegel *et al.*, 2001).

Nuestros resultados muestran, por un lado, que la carencia de caveolina-1 no afecta a la endocitosis de CTB, y tampoco a la endocitosis de GLUT4. Esto apoya que la endocitosis de GLUT4 dependa de los *rafts* lipídicos pero no de las caveolas durante la reversión de la acción de la insulina. Estos resultados no se corresponden con los obtenidos por Shigematsu *et al.* (2003) usando el dominante negativo Cav1/S80E, aunque los sistemas para anular específicamente las caveolas de la membrana plasmática son diferentes. Sin embargo, numerosos autores han mostrado la importancia de la vía endocítica no caveolar independiente de clatrina, asociada a *raft* lipídicos (revisión Kirkham *et al.*, 2005a). De hecho, se ha descrito que la endocitosis de la toxina colérica ocurre por tres vías: una vía caveolar dependiente de dinamina (Anderson *et al.*, 1996; Orlandi *et al.*, 1998; Pelkmans *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2004a), otra vía dependiente de clatrina (Nichols *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2003), y otra vía, independiente de clatrina y dinamina, pero que es sensible a tratamientos que disminuyen la cantidad de colesterol de la membrana plasmática, asociada a *raft* lipídicos (Sabharanjak *et al.*, 2002; Kirkham *et al.*, 2005a). Se ha descrito que esta última vía es fundamental en la endocitosis de CTB en MEFs de ratones *cav1*<sup>-/-</sup> (Kirkham *et al.*, 2005a) y en células que carecen de la expresión de caveolina-1 (Orlandi *et al.*, 1998; Torgersen *et al.*, 2001). Como se

ha expuesto en el apartado 2.4.1 de la sección Introducción, se ha descrito que caveolina-1 tiene un efecto negativo sobre la endocitosis dependiente de *raft* lipídicos (Minshall *et al.*, 2000; Le *et al.*, 2002; Kirkham *et al.*, 2005a). Algunos autores han propuesto un modelo en que caveolina-1 actúa como inhibidor de la endocitosis, que sólo ocurre tras la activación de dinamina. De esta manera, caveolina-1 y dinamina, añadirían un nivel más de regulación a la estructura endocítica asociada a los *rafts* lipídicos. (Baumgart *et al.*, 2003; Nabi and Le, 2003; Bacia *et al.*, 2005; Kirkham *et al.*, 2005b)

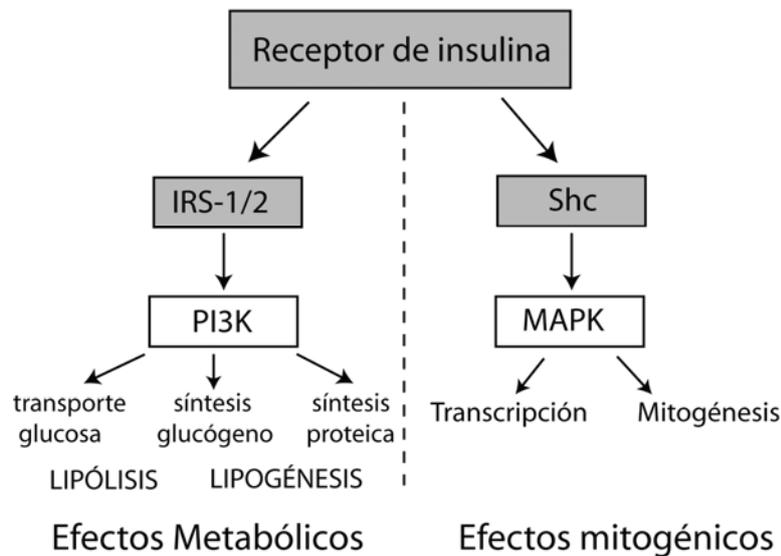
En cuanto a la metodología para la cuantificación de la endocitosis de GLUT4, como se muestra en apartado 5.4 de la sección Resultados, usamos dos aproximaciones: un método indirecto (cuantificando el porcentaje de transporte de glucosa que queda tras la reversión de la acción de insulina respecto al transporte de glucosa máximo con insulina), o bien, medimos directamente la cantidad de GLUT4 asociado a la membrana plasmática mediante inmunofluorescencia y cuantificación de la intensidad, sobre fragmentos de membrana plasmática, en los distintos momentos de reversión de la insulina y cuando la insulina está presente. Medimos por tanto, el movimiento del GLUT4 endógeno de los adipocitos.

En cambio, los autores que hemos nombrado usan la sobreexpresión de construcciones de GLUT4 con epítomos amino y/o carboxi-terminales (HA-GLUT4, HA-GLUT4-GFP, GLUT4-GFP, myc-GLUT4-GFP), lo cual les permite por un lado visualizar mejor este GLUT4 a la hora de estimar la cuantificación, como realizar marcajes contra cada uno de los epítomos antes y después de la internalización para normalizar los datos siempre respecto a la cantidad total de GLUT4.

Sería interesante complementar nuestros resultados usando estas construcciones sobre los adipocitos deficientes en caveolina-1 porque quizás ganaríamos sensibilidad en el método, y porque comprobaríamos el efecto que tiene la carencia de caveolina-1 sobre la movilización de GLUT4, al margen del efecto que observamos sobre su expresión.

### **5.3 Implicación de la caveolina-1 en otras acciones metabólicas de la insulina**

En la bibliografía se ha documentado ampliamente la ruta de señalización de la insulina que lleva a la activación de diferentes rutas de transducción de señales (Otsu *et al.*, 1991; Skolnik *et al.*, 1993; White and Kahn, 1994; Beitner-Johnson *et al.*, 1996; Cohen *et al.*, 1997; Alessi and Downes, 1998; Standaert *et al.*, 1999). Así, como se muestra en el esquema de la página siguiente muy resumidamente, la activación del receptor de insulina provoca la activación por un lado de la vía metabólica, donde son fundamentales los intermediarios IRS y PI3K y por otro, la vía mitogénica, donde actúan los intermediarios Shc y MAPK.



Esquema de las vías de señalización activadas por el receptor de insulina.

Como se ha explicado en el apartado 5.1 de esta sección, en el momento de iniciar esta tesis, estaba tomando mucha importancia una segunda vía de activación de la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática (y por tanto, el transporte de glucosa) independiente de la quinasa PI3K y dependiente de los *rafts* lipídicos, la llamada vía Cbl/TC10 (Baumann *et al.*, 2000; Chiang *et al.*, 2001; Saltiel *et al.*, 2003). Aunque posteriormente, otros autores, que no niegan la existencia de la vía de señalización, cuestionan su papel en la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática (Zhou *et al.*, 2004; Mitra *et al.*, 2004).

En nuestros objetivos estaba analizar el efecto de la deficiencia en caveolina-1 sobre otras acciones de la insulina que pudieran depender de esta vía Cbl/TC10 asociada/dependiente de caveolas/ *rafts* lipídicos.

Así, estudiamos dos efectos importantes que tiene la insulina sobre el metabolismo de los adipocitos: la inhibición de la lipólisis y la estimulación de la lipogénesis

En la figura 46 del apartado 5.5 de los resultados, comprobamos que la carencia de caveolina-1 no afecta a la inhibición que la insulina ejerce sobre la lipólisis en los adipocitos. Cuando analizamos la lipólisis inhibida por insulina usando tratamientos que desestructuran los *rafts* lipídicos (figura 6 de la sección Resultados) llegamos a la misma conclusión, tampoco se afectaba la inhibición que la insulina ejerce sobre la lipólisis. Podemos decir, por tanto, que ni los *rafts* lipídicos ni las caveolas son necesarios para la correcta inhibición de la lipólisis por la insulina. No podemos afirmar que la ruta de señalización c-Cbl/TC10 no regule de alguna forma esta acción de la insulina, ya que la eliminación de la caveolina-1 no modificó la activación de c-Cbl. Aunque el tratamiento con MCD (que une y extrae colesterol de las membranas desestructurando los *rafts* lipídicos) disminuyó la fosforilación de c-Cbl a la mitad y aún así tampoco afectó la acción de la insulina inhibiendo la lipólisis, sin embargo habría que analizar algún otro componente más tardío de esta ruta para comprobar que efectivamente se encuentra afectada por el tratamiento con MCD.

Sin embargo, también observamos que los adipocitos sicav1 presentan una tasa de lipólisis basal e inhibida por insulina, ligeramente inferior a la de los controles (en torno al 10 %). En cambio, en la figura 49 del apartado 6.2.1 de la sección Resultados, vemos que la lipólisis

basal no se afecta por la carencia de caveolina-1. Tenemos que tener en cuenta, que en estos experimentos, (los primeros), los adipocitos estaban sometidos a una pequeña dosis de adrenalina (10nM) suficiente para estimular ligeramente la lipólisis basal, pero que permite la inhibición por la insulina. Discutiremos el efecto de la carencia de caveolina-1 sobre la estimulación de la lipólisis con efectores  $\beta$ -adrenérgicos en el apartado 6.2 de esta sección.

Cuando analizamos el efecto que la carencia de caveolina-1 tiene sobre la activación que la insulina ejerce sobre la lipogénesis (figura 47 de la sección Resultados), comprobamos que, tanto la lipogénesis basal como la estimulada por insulina era menor en los adipocitos *sicav1* que en los adipocitos *scramble*. Sin embargo, la estimulación que provoca la insulina sobre la lipogénesis no varía respecto a la estimulación control.

La disminución de la lipogénesis basal no se explica con una disminución en el transporte de glucosa basal, ya que éste era similar en los adipocitos con y sin caveolina-1, a diferencia de lo que ocurría cuando usábamos los tratamientos desestructurantes de caveolas CD y MCD, donde el aumento que veíamos de la lipogénesis basal se correspondía con un aumento del transporte basal (y a una inhibición del reciclaje de GLUT4 de las membranas). En cambio, la reducción en la lipogénesis estimulada por insulina sí que podría relacionarse con el menor transporte de glucosa que presentan estos adipocitos, ya que los lípidos sintetizados *de novo* que medimos procedían de la glucosa marcada que añadimos al medio. Sería interesante analizar la activación de enzimas lipogénicas como la ATP-citrato-liasa, acetil-coA carboxilasa, o piruvato deshidrogenasa, en ausencia de caveolina-1 para esclarecer los motivos de la disminución de la lipogénesis basal.

## 6 Implicación de la caveolina-1 en el metabolismo lipídico del adipocito

Existen numerosos datos que relacionan a caveolina-1/caveolas con el metabolismo lipídico del adipocito. Así, se ha relacionado a caveolina-1 en la formación de los LDs (Cohen *et al.*, 2004b), también modulando la lipólisis activada por efectores  $\beta$ -adrenérgicos (Brasaemle *et al.*, 2004; Razani *et al.*, 1999; Cohen *et al.*, 2004b), en el balance y tráfico de colesterol y lípidos neutros en los adipocitos (Pol *et al.*, 2004; Pol *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2005) y en el transporte de ácidos grasos a través de la membrana plasmática (Pohl *et al.*, 2002; Pohl *et al.*, 2004b; Pohl *et al.*, 2005; Ring *et al.*, 2006). Además, el fenotipo de los ratones KO de caveolina-1 presentaban resistencia a la aparición de obesidad inducida por una dieta rica en lípidos y tienen altos niveles de triacilglicéridos y ácidos grasos en sangre, relacionando por tanto, a caveolina-1 con las homeostasis lipídica (Razani *et al.*, 2002a).

### 6.1 Efecto de la carencia de caveolina-1 sobre el transporte de ácidos grasos a través de la membrana de los adipocitos

Como hemos explicado en la Introducción, en humanos, la mayor parte de los triglicéridos de los adipocitos se sintetizan a partir de la captación de los ácidos grasos del medio. Esta captación, en los adipocitos, es predominantemente un proceso mediado por transportadores, ocurriendo el 90% de forma saturable (Carnicero, 1984; Stump *et al.*, 2001).

Durante el proceso de diferenciación de preadipocitos a adipocitos se incrementa la expresión de algunas proteínas implicadas en el transporte de ácidos grasos de cadena larga (LCFA), como son las proteínas CD36/FAT (*fatty acid translocase*), FABPpm (*plasma*

*membrana fatty acid binding protein*) y FATP1 (*fatty acid transport protein*) (Trigatti et al., 1991; Abumrad et al., 1999; Schaffer, 2002). Así, teniendo en cuenta las diferentes moléculas que intervienen en la captación de ácidos grasos se ha propuesto un modelo según el cual, en la membrana plasmática, los ácidos grasos se disocian de la albúmina y se unen a CD36/FAT (asociado a *rafts* lipídicos /caveolas (Souto et al., 2003; Pohl et al., 2004b), CD36 puede dirigir los ácidos grasos a FATP1 para su transporte a través de la membrana plasmática, o alternativamente, los ácidos grasos unidos a CD36 pueden protonizarse e integrarse en la monocapa externa de la bicapa de fosfolípidos de la membrana plasmática y pasar a la monocapa interna mediante el mecanismo de *flip-flop*. Una vez en la monocapa interna de la membrana plasmática, pueden ser activados por la actividad Acil-CoA sintetasa de FATP, unirse a FABP o a caveolina-1 (Pohl et al., 2005).

La relación de las caveolas con el transporte de ácidos grasos se ha establecido a tres niveles: por un lado se ha descrito que los dominios especializados *rafts* lipídicos son esenciales para regular la captación de LCFA (Ring et al., 2002; Pohl et al., 2002; Kolleck et al., 2002; Razani et al., 2002a; Vistisen et al., 2004), estas evidencias proceden sobre todo del análisis de la unión de LCFA o análogos marcados (radiactiva o fluorescentemente) a las distintas regiones de la membrana plasmática (Trigatti et al., 1991; Trigatti et al., 1999; Pohl et al., 2004b), y al análisis de transporte de LCFA usando drogas que extraen el colesterol de las membranas alterando así los *rafts* lipídicos /caveolas o usando el mutante Cav<sup>DGV</sup> que provoca que caveolina-1 no llegue a la membrana (Pohl et al., 2004b; Pohl et al., 2005; Covey et al., 2007). Estos autores encuentran que cuando se alteran los *rafts* lipídicos de esta manera, el transporte de ácidos grasos a través de la membrana plasmática disminuye.

Además, existen autores que han descrito a caveolina-1 como una proteína implicada en el transporte de ácidos grasos, debido a su capacidad de unión a los ácidos grasos de cadena larga (Trigatti et al., 1999), y a que la captación de ácidos grasos aumenta si se sobreexpresa caveolina-1 pero disminuye si se usa un dominante negativo de caveolina-1 (Pohl et al., 2004b; Meshulam et al., 2006). Además, los ratones KO de caveolina-1 son resistentes a la obesidad inducida por la dieta rica en lípidos (Razani et al., 2002a).

Por último, Pohl et al. (2005) han descrito que la localización de CD36 en los *rafts* lipídicos es necesaria para su correcto funcionamiento. Además se ha descrito que caveolina-1 es necesaria para la localización de FAT/CD36 en los *rafts* lipídicos/caveolas y para que ejerza su función en el transporte de los ácidos grasos (Ring et al., 2006).

Estos autores, (Ring et al., 2006) encuentran que los fibroblastos de embriones (MEFs) KO de caveolina-1, presentan la misma cantidad de CD36, pero que ésta, no se encuentra en la membrana plasmática, y sólo aparece en las membranas que son solubles a detergentes (DSMs). Estas células presentan menor transporte de LCFA.

Estos resultados son diferentes de los obtenidos por nosotros, que encontramos, por un lado que la localización de CD36 en los adipocitos 3T3L1 es similar en presencia o en ausencia de caveolina-1 (figura 24 y 25 de la sección Resultados) y que el transporte de LCFA en estos adipocitos, en condición basal o estimulados por insulina, es semejante (figura 44 de la sección resultados).

Sin embargo, otros autores como (Covey et al., 2007) afirman que la eliminación del colesterol inhibe la captación de LCFA, pero no afecta la localización de CD36 ni la de caveolina-1 que permanecen en la membrana plasmática. De hecho, la inhibición del transporte de LCFA provocada por los tratamientos que extraen colesterol, o por la expresión del dominante negativo Cav<sup>DGV</sup>, se revierte al añadir a las membranas colesterol (Roy et al., 1999; Pohl et al., 2004b). En este sentido, estos autores han sugerido que proteínas como las caveolinas, podrían actuar como sensores del colesterol, controlando los niveles de colesterol y por tanto la estructura y función de los *rafts* lipídicos. De tal forma que es la correcta estructura de los *rafts* lipídicos y la localización de las proteínas implicadas en la captación de LCFA como

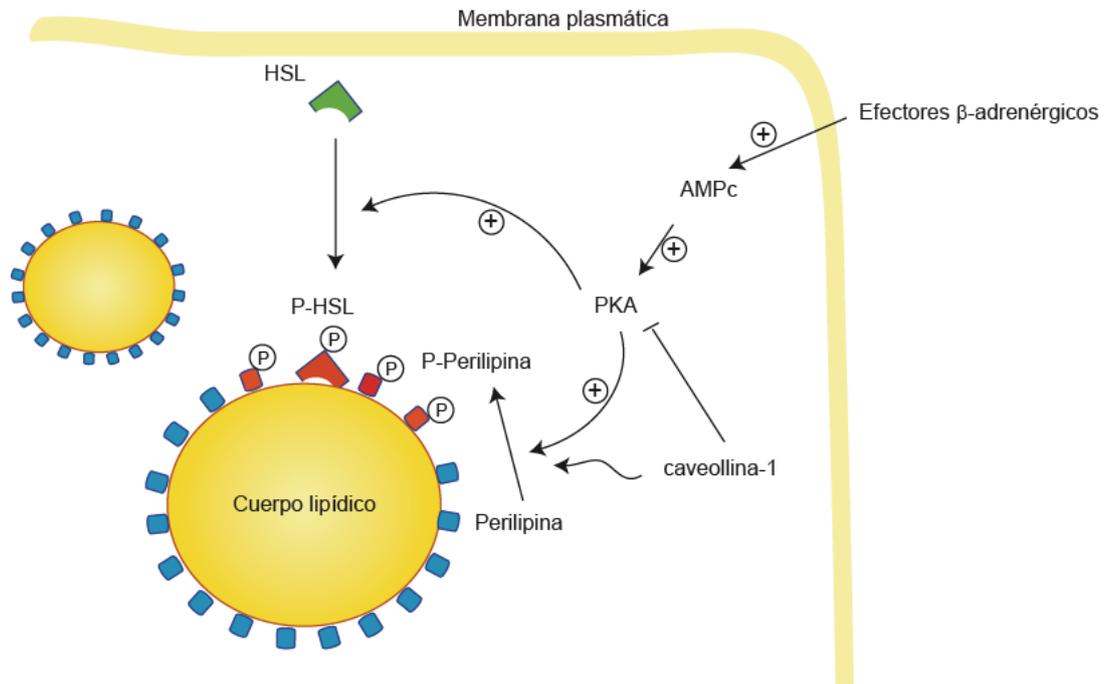
CD36 en estos *rafts* lo que es fundamental para la eficiencia del proceso. (Pohl et al., 2004a; Ehehalt et al., 2006).

En nuestro modelo de adipocitos 3T3L1 deficientes en caveolina-1 la cantidad de colesterol total en las células no varía, y la estructura y composición de los *rafts* lipídicos tampoco, por tanto, concuerda con que la captación de LCFA sea similar a la de los adipocitos control, aunque el papel de caveolina-1 en este proceso no parece fundamental, puede que su papel regulando el colesterol de las membranas y la estructura de los *rafts* lipídicos sea redundante en los adipocitos. Ya que los autores que le dan una función a caveolina-1 en este sentido (Ring et al., 2006; Meshulam et al., 2006) no usan adipocitos en sus experimentos (emplean fibroblastos de embriones de ratones KO de caveolina-1 o células como HeK293 respectivamente).

## 6.2 Efecto de la carencia de caveolina-1 sobre la lipólisis estimulada por efectores $\beta$ -adrenérgicos

La estimulación de la lipólisis con efectores  $\beta$ -adrenérgicos se ha estudiado ampliamente (Zimmermann et al., 2004; Cohen et al., 2004b; Zechner et al., 2005; Schweiger et al., 2006; Schoenborn et al., 2006; Granneman et al., 2007) y se explica en el apartado 3.4.3 de la sección Introducción, y requiere la activación de la PKA (*cAMP-dependent protein kinase*), que activa la HSL (*hormona sensitive lipase*); mediante una compleja regulación donde participa la perilipina y donde también se ha involucrado a caveolina-1, permitiendo la hidrólisis de los triglicéridos (TAG). Brevemente, PKA activa provoca por un lado la fosforilación de HSL, que entonces se transloca del citosol al LD, por otro lado PKA también fosforila a la perilipina A, que cambia de conformación, deja de actuar como protector del LD, y permite que HSL fosforilada hidrolice los TAG del LD (los efectores  $\beta$ -adrenérgicos también provocan la activación de otra lipasa, ATGL (*triacylglycerol lipase*) que es la otra lipasa fundamental en la lipólisis de los adipocitos, aunque dicha activación ocurre por una vía independiente de la descrita para HSL (Zimmermann et al., 2004; Schoenborn et al., 2006; Granneman et al., 2007; Jaworski et al., 2007). En primer lugar se describió que caveolina-1 ejerce un efecto inhibitorio sobre la PKA (Razani et al., 1999), lo cual se confirmó porque los adipocitos de ratones KO de caveolina-1 presentan la actividad de PKA aumentada, en cambio, en estos adipocitos la actividad lipolítica en presencia de efectores  $\beta$ -adrenérgicos está disminuida (5 veces) debido a que la perilipina no está fosforilada (Cohen et al., 2004b). Estos autores proponen que caveolina-1 es necesaria para la activación de perilipina A por PKA, mediante la formación de un complejo proteico PKA-caveolina-perilipina.

Además, otro estudio comprobó la presencia de caveolina-1 en los LD, solamente en los adipocitos activados lipolíticamente (Brasaemle et al., 2004).



**Esquema de la activación lipolítica por efectores β-adrenérgicos y la participación de caveolina-1.** Adaptado de (Holm, 2003).

En cambio, no observamos ninguna diferencia entre la lipólisis basal y la estimulada por efectores β-adrenérgicos (10μM isoproterenol y 0,5mM IBMX) entre los adipocitos 3T3L1 deficientes en caveolina-1 (*sicav1*) y los *scramble*, cuando analizamos la salida de glicerol al medio extracelular (figura 45). Tampoco observamos ninguna diferencia en la fosforilación de perilipina A por PKA (figura 47), ni en la salida de ácidos grasos al medio extracelular (figura 48). Aunque es cierto, que cuando analizamos el efecto de la insulina inhibiendo la lipólisis (apartado 5.5 de los resultados), los adipocitos fueron sometidos a adrenalina a una concentración 10nM tanto en condición basal, como cuando fueron estimulados por insulina 100nM. En este caso (figura 42) la lipólisis en los adipocitos deficientes en caveolina-1 sí fue ligeramente inferior a la de los adipocitos control (aproximadamente un 10-15% inferior). Puede que la deficiencia en caveolina-1 afecte a la lipólisis estimulada por efectores β-adrenérgicos, pero que este efecto quede enmascarado cuando usamos elevadas dosis de éstos o efectores más potentes. Sería interesante realizar una dosis-respuesta usando distintas concentraciones de los efectores β-adrenérgicos, así como una búsqueda de distintos efectores para comprobar si existe alguna combinación en que caveolina-1 afecte especialmente a la lipólisis.