







**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA MÉDICA Y  
BIOFÍSICA

# **PAPEL DE SAM68 EN LA DIFERENCIACIÓN DEL ADIPOCITO**

Tesis  
Doctoral de

Antonio Manuel Carmona Fernández

Dirección: Víctor Sánchez Margalet



VÍCTOR SÁNCHEZ MARGALET profesor del Departamento de Bioquímica Médica, Biología Molecular e Inmunología de la Universidad de Sevilla

CERTIFICA QUE: Don Antonio Manuel Carmona Fernández, licenciado en Biología, ha realizado bajo su dirección y en el Departamento de Bioquímica Médica, Biología Molecular e Inmunología de la Universidad de Sevilla, el trabajo: **“Papel de Sam68 en la diferenciación del adipocito”** reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Sevilla a 29 de Mayo de 2017

Director de la tesis:

**VÍCTOR SÁNCHEZ MARGALET**

El doctorando:

**ANTONIO MANUEL CARMONA FERNÁNDEZ**



# AGRADECIMIENTOS

Muchas son las personas a las que tengo que agradecer. Cada una de ellas ha sido, es y será una parte inolvidable de mi vida.

Gracias a mi director de tesis por hacer posible este manuscrito, por guiarme en el camino de la ciencia y sobre todo por el gran esfuerzo que ha hecho para conmigo. Es un orgullo haber recibido todo el apoyo y el cariño de tu parte. Gracias por todo.

Gracias a mis amigos y compañeros. Tengo la increíble suerte de haber estado rodeado de tantas y tan buenas personas. Desde el primer día que empecé aquí comprendí que lo más importante, para mí, es el grupo humano que tengo el placer de conocer. Más allá de las muchas frustraciones científicas, sin duda el compañero de viaje casi de cualquier doctorando y del esfuerzo mental exigido, yo me quedo con las muchas más experiencias vitales positivas que tuve; aquellas que llevaré siempre en el bolsillo y que son la salsa de la vida.

Gracias Carmen por ayudarme en mis inicios en todo lo que hice, me enseñaste mucho de lo que sé ahora. Gracias a Antonio, Flori, Jeni, Rox, Alberto, Isa, Sarita... sin vosotros no hubiera podido terminar este trabajo, gracias por estar a mi lado cada día. Y sobre todo, gracias por las mil risas que seguimos teniendo, ¡y que no falten nunca!

Gracias Kiú!! Y a Gome, Raúl, Joakin... por ser mis hermanos de toda la vida.

Gracias a Rafita, Enriqueta, Verónica, Miguel Lucas, Rocío, M. Carmen y secretarías del departamento, a Enrique, Teresa, Carlos, M. Carmen de Odontología, Maribel y compañía... y demás miembros del departamento por hacerme la vida tan fácil.

Gracias al “Sanedrink”: Xumari, Flora, Edu, Jessica and John. Imposible cuantificar de alguna forma lo que me habéis formado como persona, arreglando el mundo con una cerveza en la mano. Siempre nos quedará la mandanga del Pinto y de la Peña en nuestra memoria. Míe loko! Trikitrón!

Dejo en el tintero a mil y una personas a las que tendría que agradecer, desde más compañeros en la Facultad, vecinos de laboratorio, toda la sección de Bioquímica del Hospital, más gente del departamento de Histología, las niñas del Licava, las niñas argentinas, etc...

Gracias a ti, Natalia: porque te mereces todo lo bueno de este mundo.

Para terminar, doy gracias, sobre todo, a mi **familia**: por luchar tanto, por apoyarme siempre, por ser el ejemplo que intento seguir cada día, por ser como sois... soy el hombre más afortunado del mundo.





WB: ÁNGEL

***“Si buscas resultados distintos, no hagas siempre lo mismo”***

***Albert Einstein***



# I. ABREVIATURAS

<b>AB:</b>	Anticuerpo
<b>Ac:</b>	Anticuerpo
<b>AC:</b>	Adenilato ciclasa
<b>ACS:</b>	AcetilcoA sintasa
<b>ADD1/SREBP-1:</b>	Factor 1 de diferenciación y determinación del adipocito/proteína de unión al elemento regulador por esteroides-1
<b>ADP:</b>	Adenosín difosfato
<b>AGL:</b>	Ácidos grasos libres
<b>AGS:</b>	Ácido graso sintasa
<b>AMPc:</b>	Adenosín monofosfato cíclico
<b>AMPK:</b>	Proteína quinasa dependiente de AMP
<b>aP2:</b>	Proteína de unión a ácidos grasos del adipocito
<b>APS:</b>	Persulfato amónico
<b>ATP:</b>	Adenosín trifosfato
<b>C/EBP:</b>	Proteína de unión al amplificador CCAAT
<b>CCAAT:</b>	Caja de unión para C/EBP
<b>CDK:</b>	Quinasa dependiente de ciclina
<b>cDNA:</b>	ADN complementario
<b>CHO:</b>	Línea celular de ovario de hámster chino
<b>Co-A:</b>	Coenzima A
<b>CREB:</b>	Proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc
<b>DGAT:</b>	Diglicérido aciltransferasa
<b>DMSO:</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DTT:</b>	Ditiotreitól

<b>DXM:</b>	Dexametasona
<b>EDTA:</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EGF:</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>ERK:</b>	Quinasa regulada extracelularmente
<b>FATP:</b>	Proteína transportadora de ácidos grasos
<b>G1P:</b>	Glucosa 1 fosfato
<b>GAP:</b>	Proteína activadora gATPasa
<b>GDP:</b>	Guanosín difosfato
<b>GPCR:</b>	Receptor acoplado a proteína G
<b>GSK-3:</b>	Glucógeno sintasa quinasa 3
<b>hnRNP:</b>	Ribonucleoproteína nuclear heterogénea
<b>HSL:</b>	Lipasa sensible a hormonas
<b>IBMX:</b>	Isobutil-metil-xantino
<b>Ig:</b>	Inmunoglobulina
<b>IGF1:</b>	Factor de crecimiento similar a la insulina-1
<b>IL:</b>	Interleuquina (1, 2, 3...)
<b>IMC:</b>	Índice de masa corporal
<b>IRE:</b>	Elemento de respuesta a insulina
<b>IRS1/2:</b>	Sustrato receptor de insulina ½
<b>JAK:</b>	Familia de tirosín-quinasas Janus
<b>LPL:</b>	Lipoproteinlipasa
<b>MAPK:</b>	Familia de proteínas quinazas activadas por mitógenos
<b>MCP-1:</b>	Proteína-1 quimioatrayente de monocitos
<b>MEK 1-2:</b>	Quinasa estimuladora de MAPK
<b>Mtor:</b>	Diana de rapamicina en mamíferos
<b>NADPH:</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<b>NLS:</b>	Señal de localización nuclear
<b>Ob:</b>	Gen de la leptina

<b>Ob/ob:</b>	Ratones homocigotos para el gen de la leptina alterado
<b>ObR:</b>	Receptor de leptina
<b>PBS:</b>	Tampón salino fosfato
<b>PEPCK:</b>	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
<b>PI3K:</b>	Fosfatidilinositol 3-quinasa
<b>PKB:</b>	Proteína quinasa B. También denominada AKT
<b>PKC:</b>	Proteína quinasa C
<b>PKG:</b>	Proteína quinasa G
<b>PPAR<math>\gamma</math>:</b>	Receptor activador de peroxisomas- $\gamma$
<b>PRMT1:</b>	Proteína arginina metiltransferasa
<b>RBP4:</b>	Proteína de unión a retinol 4
<b>Sam68:</b>	Proteína asociada a Src en mitosis
<b>SDS:</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>SFB:</b>	Suero fetal bovino
<b>STAR:</b>	Transductor de señales y activador del metabolismo de ARN
<b>STAT:</b>	Transductores de la señal y activadores de la transcripción
<b>SUMO:</b>	Péptidos similares a la ubiquitina
<b>TEMED:</b>	Tetrametiletilenediamina
<b>TGF-<math>\beta</math>:</b>	Factor de crecimiento transformante $\beta$
<b>TNF-<math>\alpha</math>:</b>	Factor de Necrosis Tumoral $\alpha$
<b>TZD:</b>	Thiazolidinedionas
<b>UCP:</b>	Proteína desacopladora
<b>VEGF:</b>	Factor de crecimiento del endotelio vascular
<b>VLDL:</b>	Lipoproteína de muy baja densidad
<b>WB:</b>	Western blot



# ÍNDICE

---



# **I. INTRODUCCIÓN**

<b>1.</b>	<b>OBESIDAD</b>	25
<b>2.</b>	<b>TEJIDO ADIPOSO BLANCO</b>	28
2.1.	Características generales	28
2.2.	Estructura	30
2.3.	Tipos	30
2.4.	Funciones	32
-	Función metabólica	33
·	Metabolismo lipídico	34
-	Lipolisis	35
-	Lipogénesis	36
·	Metabolismo glucídico	38
-	Función endocrina	38
·	Leptina	39
·	Resistina	40
·	Adiponectina	41
·	TNF $\alpha$	41
·	Otras	41
<b>3.</b>	<b>DIFERENCIACIÓN DEL ADIPOCITO</b>	43
3.1.	Fases	44
-	Detención del crecimiento	44
-	Expansión clonal	45
-	Cambios en la expresión de genes	46
-	Estadio final	47
3.2.	Factores de transcripción	47
-	C/EBP:	47
·	C/EBP $\beta$ y $\delta$	47
·	C/EBP $\alpha$	49
-	PPAR $\gamma$	50
<b>4.</b>	<b>SAM68</b>	54
4.1.	Dominios estructurales y funcionales	54
-	Dominio GSG	55
-	Regiones ricas en prolina. Dominio SH3	56
-	Regiones ricas en tirosina. Fosforilaciones. Dominio SH2	57
-	Señal de localización nuclear	58
-	Dominio rico en Arginina-Glicina. Metilaciones	58
-	Otras modificaciones post-traduccionales	59
4.2.	Genética	59

4.3. Funciones biológicas	60
- Mitosis y regulación del ciclo celular	60
- Transducción de señales	61
- Receptor de insulina	62
- Sistema inmune	64
·Receptor de leptina	64
·Receptor de linfocitos	65
- Procesamiento del ARN	65
·Regulación transcripcional	66
·Corte-empalme alternativo	66
- Desarrollo	67
- Diferenciación celular	67
- Cáncer	69
·Supresión de tumores	69
·Apoptosis	70
·Papel prooncogénico	70
- Metabolismo vírico	71

## **II. OBJETIVOS**

1. OBJETIVOS	75
--------------	----

## **III. MATERIAL Y MÉTODOS**

1. CULTIVOS CELULARES	79
1.1. Línea celular 3T3-L1	79
1.2. Medios de cultivo	79
·Medio de crecimiento	79
·Medio de diferenciación	80
2. WESTERN-BLOT	80
2.1. Tampones	80
- PBS	80
- Extracción	80
- Laemli	81
- Running	81
- Transferencia	81

---

- Bloqueo	82
- Lavado	82
2.2. Geles	82
- Separación	82
- Concentración	82
2.3. Anticuerpos	83
-Primarios	83
-Secundarios	83
<b>3. INMUNOPRECIPITACIÓN</b>	<b>83</b>
3.1 Anticuerpos	83
<b>4. Q-PCR</b>	<b>85</b>
4.1 Primers	85
<b>5. TINCIÓN POR OIL-RED</b>	<b>86</b>
<b>6. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPAMIENTO</b>	<b>86</b>
6.1 Reactivos	86
6.2 Materiales	87
6.3 Equipamiento	88
<b>7. METODOLOGÍA</b>	<b>89</b>
7.1. Crecimiento y diferenciación celular	89
7.2. Transfección	90
7.3. Q-PCR	91
- Aislamiento de ARN	91
- Retrotranscripción	92
- PCR	93
7.4. Western-blot	94
- Extractos proteicos	94
- Electroforesis-electrotransferencia	94
- Inmunodetección y análisis densitométrico	95
7.5. Inmunoprecipitación	95
7.6. Oil-red	97
7.7. Cuantificación de triglicéridos	98
<b>8. ESTADÍSTICA</b>	<b>98</b>

#### **IV. RESULTADOS**

<b>1. NIVELES DE SAM68 DURANTE LA ADIPOGÉNESIS</b>	101
<b>2. FOSFORILACIÓN EN TIROSINA DE SAM68</b>	103
<b>3. EFECTOS DE LA SOBREENPRESIÓN DE SAM68 DURANTE LA DIFERENCIACIÓN</b>	104
2.1. SAM68	104
2.2. C/EBP $\beta$	105
2.3. C/EBP $\delta$	107
2.4. C/EBP $\alpha$	109
2.5. PPAR $\gamma$	110
<b>4. EFECTOS DE LA INHIBICIÓN DE SAM68 DURANTE LA DIFERENCIACIÓN</b>	112
2.1. SAM68	112
2.2. C/EBP $\beta$	113
2.3. C/EBP $\delta$	115
2.4. C/EBP $\alpha$	116
2.5. PPAR $\gamma$	117
<b>4. CUANTIFICACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS</b>	118
<b>5. MORFOLOGÍA CELULAR</b>	119

#### **V. DISCUSIÓN**

<b>1. DISCUSIÓN</b>	123
1.1. Expresión de Sam68 en el proceso de diferenciación de los adipocitos	126
1.2. Fosforilación en tirosina de Sam68 durante la adipogénesis	127
1.3. Efectos de la sobreexpresión e inhibición de Sam68 en la diferenciación de los adipocitos:	
- SAM68	129
- C/EBP $\beta$	129
- C/EBP $\delta$	131
- C/EBP $\alpha$	132

- PPAR  $\gamma$  \_\_\_\_\_ 132

**VI. CONCLUSIONES**

**1. CONCLUSIONES** \_\_\_\_\_ 137

**VII. BIBLIOGRAFÍA**

**1. BIBLIOGRAFÍA** \_\_\_\_\_ 141



# INTRODUCCIÓN



## **I. INTRODUCCIÓN**

Sam68, sustrato de Src en mitosis, es una proteína STAR (transductor de señales y activador del metabolismo de ARN) que está involucrada en diversos y muy importantes procesos biológicos tales como la regulación de la expresión génica, corte-empalme alternativo, señalización, ciclo celular, exportación de ARN, traducción de proteínas, etc... Debido a esta gran variedad de funciones diferentes es fácil pensar en la importancia de conocer cada uno de los mecanismos biológicos donde se ha encontrado su participación. Nuestro grupo ha trabajado en el papel de Sam68 en la señalización del receptor de insulina y leptina. La insulina es uno de los factores necesarios para la diferenciación del adipocito, y la leptina es una adipocina producida fundamentalmente por el adipocito. Por tanto pensamos que Sam68 podría tener algún papel en la diferenciación del adipocito

### **1. OBESIDAD**

La obesidad se ha convertido en uno de los principales problemas de salud pública de los países desarrollados. Su incidencia ha ido aumentando en los últimos años y en estos momentos se encuentra en plena expansión. Según el Ministerio de Sanidad aproximadamente el 16% de la población española es obesa. El problema se agrava con la gran variedad de enfermedades que trae asociada la obesidad (Figura 1) como un mayor riesgo de padecer cáncer de mama y de colon, resistencia a la insulina y sobre todo diabetes tipo 2 y enfermedad cardiovascular, que hacen de la obesidad un problema sociosanitario de primer nivel por su morbi-mortalidad.

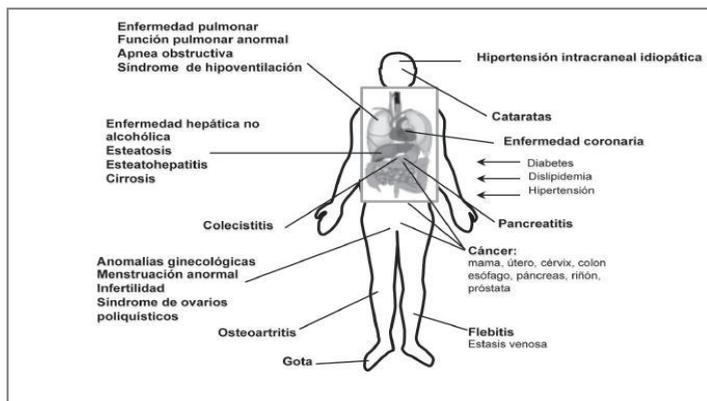


Figura 1: Complicaciones de la obesidad

La obesidad se caracteriza por un incremento en la masa de tejido adiposo que es el resultado de un aumento en el tamaño de las células ya existentes (hipertrofia) y de un incremento en el número de adipocitos (hiperplasia). Dicho aumento de células es controlado, en parte, por la diferenciación de los precursores celulares, que van desde células madre específicas de tejido hasta preadipocitos. Por ello la regulación de la diferenciación, desde el estado de preadipocito a adipocito maduro, es un proceso de gran importancia. De esta forma el adipocito adquiere su fenotipo por cambios en la expresión de un variado número de genes que van a guiar todos estos cambios, tanto morfológicos como metabólicos, para un correcto desarrollo del tejido adiposo.

Por otro lado la obesidad se caracteriza también por ser un estado crónico de inflamación de bajo grado [1,2] dado que se produce un aumento en los niveles circulantes de varios marcadores de inflamación entre los que se encuentran la IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-18, TGF- $\beta$  y la proteína C reactiva [3,4] que son adipocinas producidas por el adipocito. Además, la proliferación y activación de macrófagos en este tejido se ha relacionado con dichos estados inflamatorios que se asocian con la obesidad como patología. Por esto se piensa que la producción de estas adipocinas inflamatorias puede ser la causa del desarrollo de enfermedades asociadas a la obesidad como la diabetes tipo 2, la arterioesclerosis, así como otros componentes del síndrome metabólico [5,6].

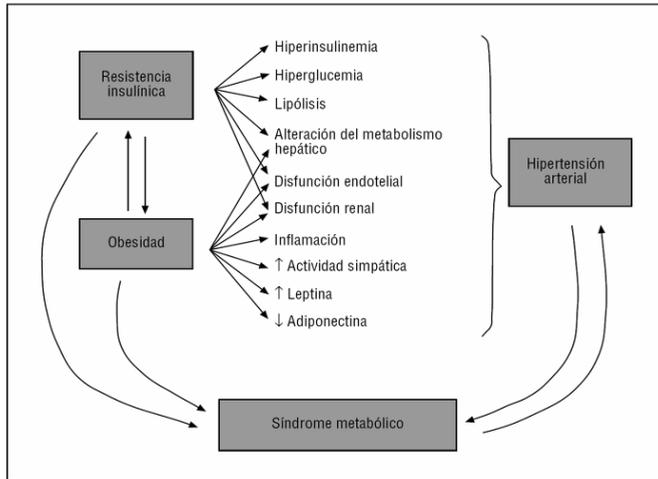


Figura 2: Esquema de alteraciones asociadas a la obesidad

Sin embargo otras adipocinas, como la adiponectina, son encontradas con niveles disminuidos en la obesidad y tiene una actividad anti-inflamatoria, además de modular favorablemente la sensibilidad a la insulina. En el caso de la proteína C reactiva y de la IL-18 se ha visto una caída de sus niveles cuando se produce una reducción de peso [7,8]. Estos antecedentes irían a favor de la hipótesis que consideraría posible que con la modificación de la capacidad de expresión de algunas de estas adipocinas se podría conseguir un tipo más beneficioso de adipocito. Por lo tanto, una buena terapia para luchar contra la obesidad podría pasar por la idea de que el propio adipocito pueda ser beneficioso para luchar contra su fenotipo alterado, haciendo simplemente que los preadipocitos presentes en el tejido adiposo se diferencien a adipocitos con un balance metabólico favorable. En esta línea, existe un trabajo [9] que describe la capacidad adipogénica de la miostatina un miembro de la familia TGF- $\beta$  y que es un factor inhibitor de diferenciación y crecimiento del músculo [10]. En este trabajo se observa que los adipocitos inducidos por la miostatina (añadido en la mezcla de diferenciación) son más pequeños y expresan marcadores de adipocitos inmaduros. En ratones, estos efectos producen una elevación sistémica de la sensibilidad a la insulina y resistencia a la ganancia de peso inducida por la dieta.

Por todo esto consideramos que un mayor conocimiento del tejido adiposo, y más concretamente de la diferenciación adipogénica, podría abrir el camino a nuevas terapias que permitan un mayor control de la obesidad.

## 2. TEJIDO ADIPOSO BLANCO

### 2.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES

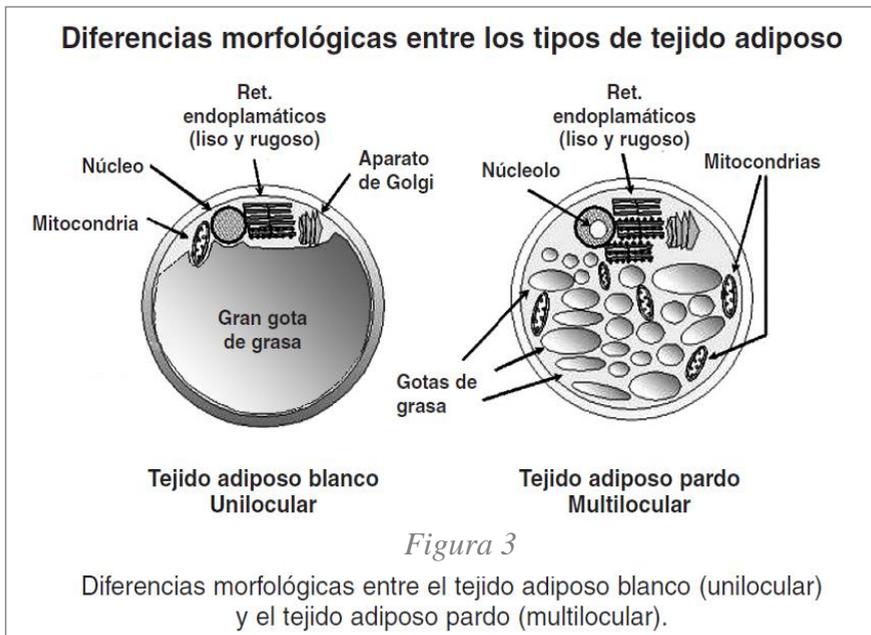
El tejido adiposo es un órgano, principalmente de reserva energética, que cumple también otras funciones como órgano endocrino y que contribuye a la salud y a la estética de las personas. La relación entre sobrepeso-obesidad y el desarrollo de algunas enfermedades no transmisibles es una evidencia científica. Sin embargo es común asociar al tejido adiposo solo como un reservorio energético. Ahora sabemos que las células que mayoritariamente forman este tejido, los adipocitos, tienen una gran variedad de funciones relacionadas con la homeostasis corporal.

Existen dos tipos principales de tejido adiposo: el pardo y el blanco. El primero aparece en humanos durante el desarrollo fetal, pero disminuye a partir del nacimiento y durante la primera década de vida. En los adultos se conserva tejido adiposo pardo, en pequeños cúmulos, dentro del tejido adiposo blanco [11]. A diferencia del tejido adiposo blanco, presentan un citoplasma granuloso y multilocular (Figura 3) con múltiples gotas de triglicéridos de diferente tamaño, un mayor número de mitocondrias y realiza lo que se conoce como termogénesis adaptativa o facultativa, que es la capacidad que tiene el organismo para responder al frío.

El segundo, el tejido adiposo blanco, es el tipo predominante en todas las especies adultas y el cuál se ha estudiado en este trabajo. La naturaleza del tejido adiposo blanco in vivo y su complejidad dificulta su estudio, por lo que se han creado líneas celulares que han ayudado a una mayor comprensión de los diversos mecanismos celulares y moleculares que tienen lugar durante la transición de preadipocitos indiferenciados, tipo fibroblastos, hasta células redondeadas maduras [12], siendo la secuencia de eventos transcripcionales de la diferenciación la mejor identificada [13].

El modelo mejor estudiado para estudiar la diferenciación del adipocito es el de la línea celular 3T3-L1, desarrollado por Green y colaboradores en los años 70. Estas células murinas se comportan proliferativa y morfológicamente como fibroblastos. Cuando confluyen y

se les trata con un cóctel de agentes proadipogénicos, llevan a cabo una diferenciación en el transcurso de una semana aproximadamente. Este modelo in vitro parece bastante fiel con respecto a su homónimo in vivo, en tanto que las células acumulan lípidos, expresan virtualmente todos los marcadores de adipocitos maduros y se vuelven sensibles a la insulina. Su disponibilidad y su homogeneidad (en contraste con el tejido adiposo in vivo que contiene un gran número de células no adiposas) contribuyen a su utilidad. Sin embargo sabemos que para asentar el conocimiento de los resultados obtenidos con esta línea son necesarios estudios in vivo o en otras líneas preadipogénicas con diferentes características tales como la NIH-3T3, 3T3-F442A o la C3H10T1/2.



## **2.2 ESTRUCTURA**

El tejido adiposo blanco es considerado un órgano difuso con una gran actividad metabólica, siendo una importante reserva energética [14] y comprende entre el 15-25% (variando según género) del peso corporal de una persona adulta no obesa. Histológicamente está formado por un 60-70% de adipocitos y el resto por células sanguíneas, endoteliales, macrófagos y precursores de adipocitos de diferente grado, ya sean fibroblastos como precursores primarios o preadipocitos como células como células predispuestas a transformarse en adipocitos[11].

Tiene estructura unilocular y es principalmente de color amarillo. Los adipocitos de este tipo de tejido tienen una gota central de triglicéridos que puede ocupar el 90% del volumen celular quedando un citoplasma muy reducido (Figura 3). El núcleo ovalado también se desplaza a la zona periférica y no suele presentar nucleolo visible. Este tipo de adipocitos tienen pocas mitocondrias, un retículo endoplásmico liso y rugoso de baja densidad y un complejo de Golgi pequeño.

También sabemos que es un tejido altamente vascularizado, hasta el punto de que cada adipocito está conectado con un capilar, lo que provoca una entrada y salida rápida de metabolitos y de diferentes moléculas secretadas (adipocinas) que regulan muchos procesos biológicos.

## **2.3 TIPOS DE TEJIDO ADIPOSO BLANCO**

Existen 2 subtipos de tejido adiposo blanco según cómo y dónde se encuentra distribuido:

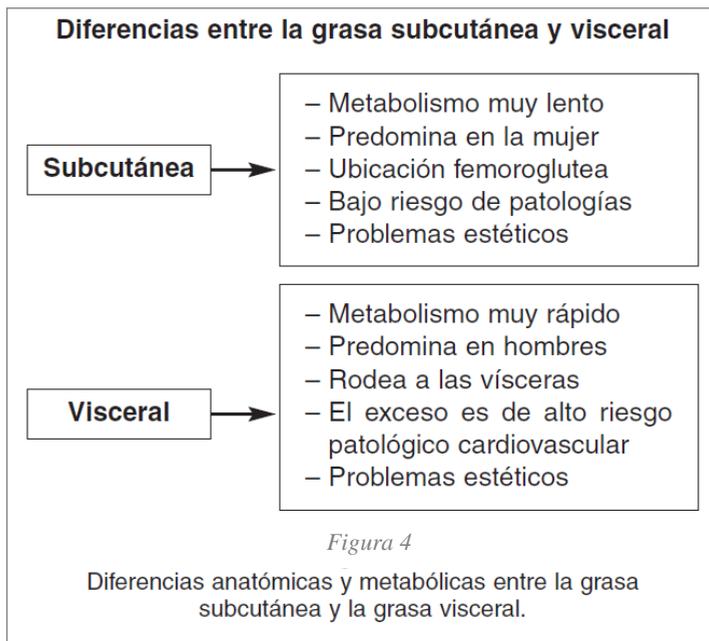
### **- Tejido adiposo subcutáneo o grasa subcutánea:**

Es el que comprende un mayor volumen, hasta el 80% del total de grasa acumulada. Su metabolismo es más lento que en el otro subtipo y su función principal es de aislante térmico y amortiguación mecánica.

### - Tejido visceral o intraperitoneal:

Se ubica en las regiones profundas de la cavidad abdominal rodeando a las vísceras. Corresponde al 5-10% del total de grasa acumulada. Respecto al metabolismo es mucho más activo, generalmente, con un índice de lipogénesis-lipólisis alto. Desde un punto de vista funcional su localización permite que los metabolitos sean recogidos por la vena Porta y de esta forma los ácidos grasos libres sintetizados son transportados directamente al hígado constituyendo un aporte energético al metabolismo general.

Por otro lado, habría que tener en cuenta que un exceso de ácidos grasos en el hígado puede provocar hiperinsulinemia, dislipidemia e hiperglicemia. Además su asociación con patologías como diabetes tipo II, hipertensión y enfermedades cardiovasculares es ya evidente. [15].



## 2.4 FUNCIONES

Al ser un tipo muy especializado de tejido, almacenando lípidos, el tejido adiposo blanco tiene un rol muy importante en el metabolismo energético. Es capaz de regular la movilización de grasas almacenadas en los adipocitos para cualquier necesidad energética del individuo, tanto de una forma anabólica como catabólica. Además es conocido desde hace años una importantísima función secretora que convierten al tejido adiposo en un potente órgano endocrino, capaz de actuar aparte de la homeostasis energética, en inmunología, reproducción, hemostasia y angiogénesis [16]. Además de estas funciones, ya bien conocidas (Figura 5), actualmente se siguen encontrando otras nuevas relacionadas con muchas de las adipocinas secretadas por el tejido adiposo y que actúan a diferentes niveles en el organismo.



Figura 5. Funciones del tejido adiposo. El tejido adiposo secreta una gran variedad de moléculas bioactivas que le permite participar en el control de numerosos procesos en el individuo (Modificado de Frühbeck y Gómez-Ambrosi, 2005).

## - Función metabólica

El tejido adiposo es solo uno de los muchos sistemas encargados de la homeostasis energética del organismo. Cada órgano o tejido involucrado en él desempeña una función específica donde se desarrollan las actividades metabólicas necesarias para dicho fin (Figura 6). Entre ellos se encuentra el hipotálamo, que ejerce el papel de centro regulador del gasto energético y de la ingesta; el páncreas, en su rol de órgano endocrino vital en el metabolismo de azúcares, lípidos y proteínas; el hígado, como el órgano metabólico principal del organismo y el músculo esquelético, que será el principal tejido donde se usará la energía.

Con respecto al tejido adiposo se sabe que juega también un papel fundamental en el control de la homeostasis energética, más concretamente en el almacenamiento de la energía, como hemos comentado anteriormente. Así que, por todo lo dicho, se necesita la existencia de una red hormonal altamente especializada que asegure una comunicación eficiente y rápida entre todos estos órganos para controlar la ingesta, el procesamiento de los nutrientes y la distribución de la energía disponible entre las diferentes rutas metabólicas [17].

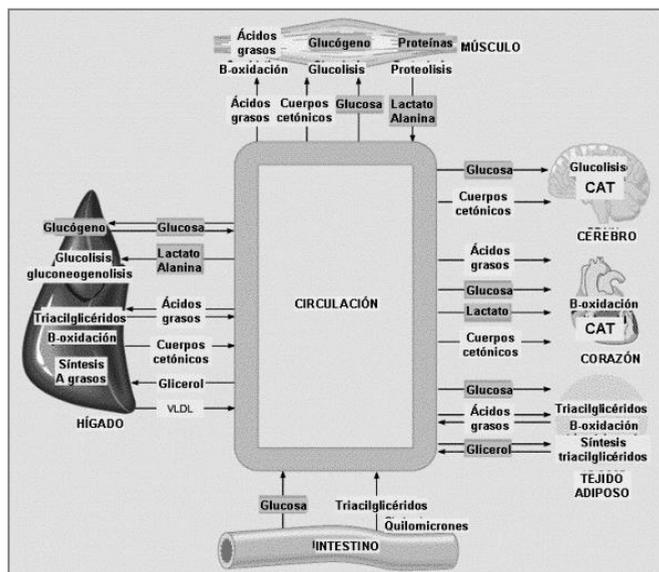


Figura 6: Homeostasis energética (Adaptado de Sanchez-Lasheras et al, 2010)

Para hacer posible todo esto el tejido adiposo regula la liberación o captación de energía a través de diversos sistemas metabólicos que comentamos a continuación:

- Metabolismo lipídico

Para introducir este tema se muestra la gráfica 7, donde se puede observar, desde un punto de vista fisiológico, cómo se transforman las grasas en ácidos grasos libres y cómo son transportadas hasta llegar al tejido adiposo, esquelético o hepático, principalmente. Se puede observar cómo las grasas son hidrolizadas en el intestino delgado debido a la actuación de la lipasa pancreática; luego los ácidos grasos se absorben a través del retículo endoplásmico del epitelio intestinal para formar de nuevo triglicéridos que ahora son rodeados por unas proteínas específicas creando los quilomicrones. Estos salen por la membrana basolateral de las células epiteliales con dirección a los vasos quilíferos donde serán transportados por la linfa hacia la sangre. Los quilomicrones son utilizados por todos los tejidos, por activación de la LPL endotelial gracias a la apo-CII, así se van descargando de triglicéridos hasta que los restos (remanentes de quilomicrones) son metabolizados en el hígado con la lipasa hepática gracias al receptor de Apo-E. Los ácidos grasos y colesterol sintetizados en el hígado son empaquetados en las VLDL y secretadas a la sangre. Una vez en los capilares del tejido adiposo, tanto los quilomicrones como las VLDL son expuestos a la LPL endotelial, que provoca la descomposición en ácidos grasos y glicerol que son transportados hacia el interior del adipocito. A continuación se produce de nuevo la formación de triglicéridos en el citoplasma celular y pasan a formar parte de la gota lipídica del interior del adipocito.

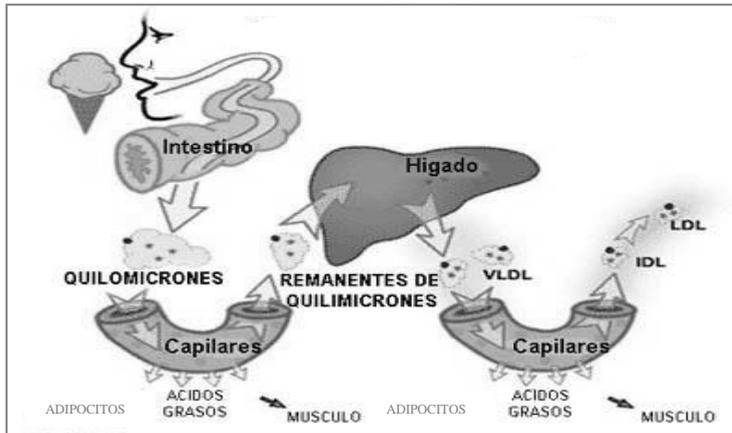


Figura 7: Transporte de lípidos en el metabolismo lipídico.

Como se ha demostrado el adipocito es capaz tanto de usar la energía conservada en la gota lipídica (lipólisis) como, por el contrario, continuar aumentando la cantidad de triglicéridos intracelular (lipogénesis). A continuación se detalla cada uno de estos procesos:

#### · Lipólisis

Es el proceso por el cual los triglicéridos acumulados en el tejido adiposo son hidrolizados a ácidos grasos y glicerol. Este proceso está mediado por una enzima muy sensible a los cambios hormonales (LSH: lipasa sensible a hormonas). Dicha enzima es regulada de forma compleja por diferentes vías (Figura 8):

La primera de ellas es a través de las catecolaminas, que transmiten la señal a través de receptores acoplados a proteína G, tales como los receptores  $\beta$ -adrenérgicos actuando a nivel intracelular aumentando los niveles de AMPc por estimulación de la adenilato ciclasa (AC) que activa la proteína PKA la cual provoca la activación de la enzima HSL.

La segunda forma conocida de control se realiza también mediante una variación de los niveles de AMPc intracelular, pero a través de la vía de la insulina. Esta, tanto en hígado, músculo como en tejido adiposo, inicia una compleja red de señalización mediada por su receptor

provocando una cascada de señalización que afecta a la actividad de la fosfodiesterasa 3B (PDE-3B) promoviendo un descenso en los niveles de AMPc.

Por todo lo visto podemos decir que un aumento en los niveles de AMPc implica un aumento de la lipólisis y viceversa.

Otra forma de control es la que se realiza a través de los péptidos natriuréticos, implicados en la regulación de la presión arterial y volumen sanguíneo. Recientemente se ha descubierto que también podrían tener una función en el metabolismo lipídico, actuando sobre la lipólisis [18]. En este caso la forma de actuación sobre el proceso es mediante el aumento de los niveles de GMPc intracelular, que conlleva una activación de la proteína quinasa G (PKG).

Existen otras formas de control mediante hormonas hipofisarias. Los adipocitos presentan receptores específicos para las hormonas secretadas por la hipófisis, excepto las gonadotropinas [19]. Hasta la fecha se conocen varias hormonas hipofisarias que presentan una función en la regulación de la lipólisis como la prolactina, que actúa como hormona antilipogénica reduciendo el transporte de glucosa [20]. O cómo la TSH (hormona estimulante del tiroides) también estimula la lipólisis al aumentar la concentración de AMPc intracelular [21]. También se conoce cómo la GH u hormona del crecimiento ejerce un efecto antilipogénico antagonista a la insulina y cómo la ACTH actúa sobre el tejido adiposo incrementando la lipólisis vía PKA [22].

Otros reguladores del metabolismo del adipocito conocidos son la adenosina, la angiotensina, las prostaglandinas, IL-6, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , andrógenos y estrógenos.

#### · Lipogénesis

Es la síntesis de ácidos grasos esterificados para formar triglicéridos. En humanos y ratones se realiza principalmente en el hígado siendo el tejido adiposo blanco partícipe en menor grado y aunque la lipogénesis en el hígado es más activa que en adipocito, ambos producen la misma cantidad diaria, debido al volumen o extensión del tejido adiposo.

La mayor fuente de triglicéridos que acumula el adipocito proviene de quilomicrones y VLDL circulantes del torrente sanguíneo. Estos triglicéridos unidos a proteínas serán hidrolizados por una enzima, LPL, dando lugar a ácidos grasos que serán introducidos en el adipocito a través de procesos de transporte activo. Una vez en el interior se reesterifican de nuevo y se depositan en el interior de la gran gota lipídica.

También existe la posibilidad de sintetizar triglicéridos utilizando otro precursor: la glucosa. A este proceso se le conoce como “Lipogénesis de novo”:

En primer lugar la glucosa en exceso es metabolizada en la glucólisis hasta acetil-CoA por la Ac-CoA carboxilasa, y luego al formarse el malonil-CoA actúa la ácido graso sintasa para formar palmitato y consecuentemente se crean ácidos grasos que pasan a formar parte de los triglicéridos de la gota lipídica.

Como resumen metabólico lipogénico se presenta este gráfico a continuación:

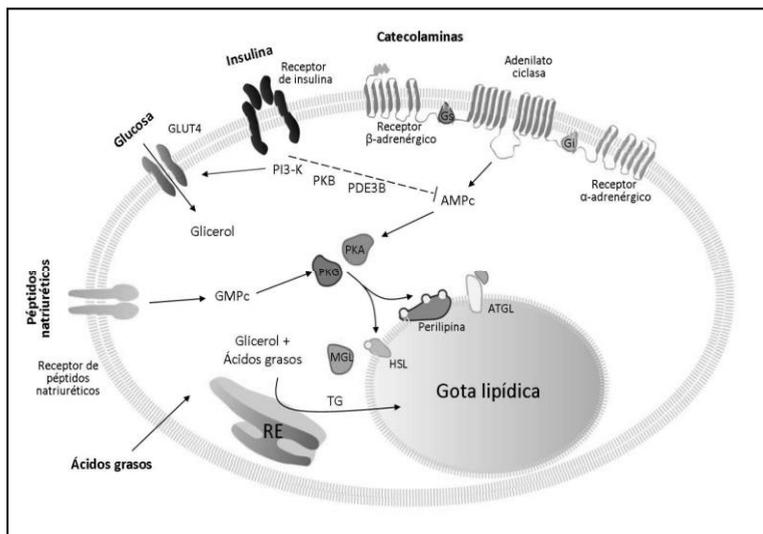


Figura 8. Principales reguladores del metabolismo lipídico en adipocitos. Catecolaminas y péptidos natriuréticos regulan el proceso de lipólisis aumentando los niveles intracelulares de AMPc y GMPC, respectivamente, activando a lipasas que hidrolizan los triglicéridos acumulados en el interior de las gotas lipídicas. La insulina inhibe el proceso anterior disminuyendo los niveles de AMPc, a la vez que aumenta la actividad lipogénica celular. PI3K: Fosfatidil inositol 3-quinasa; PKB: Proteína quinasa B; PDE3B: Fosfodiesterasa 3B; PKA: Proteína quinasa A; PKG: Proteína quinasa G; MGL: Lipasa de monoglicéridos; HSL: Lipasa sensible a hormonas; ATGL: Lipasa de triglicéridos adipocitaria; TG: Triglicéridos; RE: Retículo endoplasmático (Modificado a partir de Langin, 2010).

## - Metabolismo glucídico

El metabolismo lipídico está estrechamente relacionado con el glucídico, desde que Randle y colaboradores en 1963 propusieron el concepto del “ciclo glucosa-ácidos grasos”, donde se proponía que un incremento en la disponibilidad de los ácidos grasos plasmáticos provoca una disminución del uso de glucosa en músculo y una acumulación de triglicéridos.

El metabolismo glucídico también está íntimamente relacionado con la insulina, que activa el transporte de glucosa hacia el interior de la célula y la síntesis de glucógeno en aquellos tejidos sensibles a su acción, como por ejemplo el hígado. Aquí la glucosa se almacena en forma de glucógeno, sin embargo en condiciones de exceso, esta entra en la ruta de la glucólisis formando los precursores de la lipogénesis “de novo”, antes mencionada, y aumentando la concentración de lípidos, que pueden ser almacenados en forma de triglicéridos o exportados en forma de VLDL donde pueden ser absorbidos por el tejido adiposo.

Sin embargo tanto en tejido adiposo como en el músculo esquelético el papel de la glucosa es mucho menos importante, comparado con su papel en el hígado.

## **Función endocrina**

Como hemos comentado en los últimos tiempos el tejido adiposo blanco se ha considerado como un órgano endocrino por su capacidad para secretar hormonas y citoquinas. Así pues el tejido adiposo es también reconocido como un participante fundamental en el control del metabolismo. Estas moléculas secretadas por el adipocito actúan a través de mecanismos autocrinos, paracrinos y endocrinos; además el número de adipocinas se ha incrementado rápidamente en los últimos tiempos: leptina, adiponectina, resistina, serpina, lipocalina-2, Pai-1, RBP4, Zn  $\alpha$ 2 glicoproteína, vaspina, visfatina, omentina, apelina y chimerina y también TNF-  $\alpha$ , IL-6 y MCP-1, entre otras... que ejercen funciones que van desde la respuesta inflamatoria a la migración celular. También se sabe

que la actividad metabólica del tejido adiposo para producir estas proteínas varía según la localización corporal del depósito adiposo.

El interés que ha despertado esta nueva faceta endocrina del tejido adiposo ha llevado a la comunidad científica a intentar identificar y estudiar el papel que tiene cada proteína secretada por este tejido en procesos tales como la diabetes, la obesidad y complicaciones cardiovasculares relacionadas.

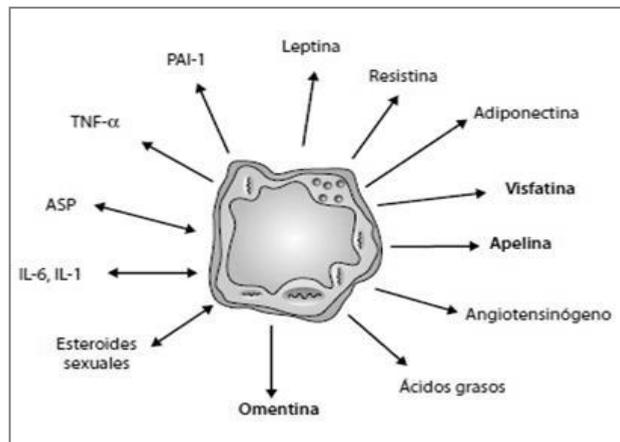


Figura 9: Tejido adiposo como órgano endocrino

### - Leptina

La leptina es la proteína del gen *ob*. Se demostró que su ausencia es la responsable del fenotipo obeso, de la diabetes y de la resistencia a la insulina en ratones [23]. El gen *ob* codifica una proteína de 16 kDa de peso que tiene una estructura en forma helicoidal que se asemeja bastante al de otras citoquinas. Aunque el principal tejido que expresa leptina es el tejido adiposo, también se detectan bajos niveles en epitelio gástrico y mamario, en cerebro y en músculo esquelético [24]. También se ha descubierto que la placenta es un productor tan bueno o mejor que el tejido adiposo. Por eso las mujeres embarazadas tienen valores más altos de leptina en sangre, comparado con las mujeres no embarazadas, aunque estén delgadas, y la leptinemia cae inmediatamente después del parto [25].

Una vez secretada puede circular libre o unida a proteínas siendo el riñón el encargado de eliminarla.

Un efecto por el que se caracteriza la leptina es por su capacidad como reguladora del balance energético a través de la regulación del gasto de energía. En humanos los niveles de leptina dependen del estado energético del organismo y de la cantidad de energía almacenada, así la mayoría de individuos obesos tienen niveles elevados de leptina circulante y muestran resistencia a la leptina, siendo los niveles en individuos delgados bastante más bajos.

Existen otras muchas funciones de la leptina descritas hasta la fecha, que van desde la angiogénesis [26], la hematopoyesis [27] y la función inmune [28];[29-31], hasta funciones muy importantes en reproducción [25] e inflamación [32].

#### - Resistina

Péptido secretado por el adipocito de 12.5 kDa, rico en residuos serina y cisteína. La resistina es una adipocina secretada especialmente durante la adipogénesis como se ha podido ver en adipocitos de ratón [33].

La resistina, en ratones, induce intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina, probablemente a través de un aumento de los niveles de enzimas gluconeogénicas en el hígado. Se expresa en los dos tipos de tejido adiposo y en las glándulas mamarias. Sabemos que la resistina actúa a niveles del músculo esquelético y tejido adiposo, pero su papel y los mecanismos moleculares de su acción no se conocen bien. Los niveles de expresión de resistina dependen del tamaño de los depósitos de grasa, sexo, etc... ya que la mayor expresión de resistina se encuentra en la grasa perigonadal de ratones hembras. Por esto podemos decir que la resistina produce unos efectos antagónicos a la insulina en el metabolismo de la glucosa, además induce la diferenciación del adipocito y la expresión de genes que incrementan la captación de ácidos grasos, lo que explica su posible papel en la diabetes cuando se asocia a la resistencia a la insulina [34,35]. Esto parece claro en ratones, pero no se ha podido confirmar en humanos, donde la resistina se expresa sobre todo en monocitos y linfocitos.

### - Adiponectina

Es una adipocina que aumenta la sensibilidad a la insulina, decreciendo el flujo de ácidos grasos no esterificados incrementando su oxidación en hígado y músculo acompañado por un incremento en la expresión de genes implicados en el transporte y utilización de ácidos grasos [36]. Tiene un tamaño de 30 kDa. Se encuentra en plasma formando trímeros, hexámeros, etc... [37] e incrementa la expresión de PPAR- $\gamma$  en tejido adiposo. También sabemos que la adiponectina induce la fosforilación de AMPK y su activación en músculo e hígado [37], provocando un aumento en el catabolismo de lípidos, disminuyendo las reservas de triglicéridos y el riesgo de desarrollo de resistencia a la insulina. Se sabe que está implicada en la fosforilación del sustrato de receptor de insulina (IRS) y también aminora relativamente los efectos de TNF- $\alpha$ , inhibiendo la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales vasculares provocando una disminución del riesgo aterogénico. Su acción viene mediada por varios tipos de receptores que suelen asociarse a efectos “beneficiosos” en las células diana donde los encontramos, ya que existen a niveles muy bajos en personas y animales obesos.

### - Factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ )

Es una citoquina que ejerce una gran variedad de funciones. Implicada en anomalías metabólicas y fisiológicas en estados de caquexia, se sobreexpresa en tejido adiposo y muscular en individuos obesos y en modelos de obesidad en roedores. Esta adipocina se asocia con un carácter negativo para la salud en algunas enfermedades.

### - Otras adipocinas de interés:

·*Apelina*: Involucrada en funciones cardiovasculares y homeostasis de fluidos ya que incrementa la contractibilidad cardíaca y disminuye la presión sanguínea. Así, como la adiponectina, la apelina es una adipocina con una influencia favorable sobre el metabolismo.

- Visfatina*: Participa en la homeostasis de la glucosa y es conocida como la forma extracelular de la enzima Nampt (nicotinamide phosphoribosyltransferase), esencial en el mecanismo de la producción de insulina en las células  $\beta$  pancreáticas; esta adipocina también se asocia con un carácter beneficioso en algunas patologías.
- IL-6*: Inhibe el apetito, inhibe la gluconeogénesis, incrementa la síntesis *de novo* de ácidos grasos y colesterol en hígado.
- Pref-1*: Inhibe la adipogénesis. La sobreexpresión afecta a la tolerancia a glucosa, sensibilidad a insulina e induce hipertrigliceridemia.
- Omentina*: Contribuye a la regulación del metabolismo lipídico y a las diferencias fisiológicas de tejido adiposo visceral y subcutáneo. Mejora la sensibilidad a insulina. Secretada por la fracción de estroma vascular.

Por todo lo dicho anteriormente, y puesto que las adipocinas participan en una gran variedad de procesos, se requiere un control estricto de su secreción, ya que una modificación en la concentración de las mismas en plasma pueden causar importantes alteraciones en el organismo.

### 3. DIFERENCIACIÓN DEL ADIPOCITO

La diferenciación del adipocito es el resultado de la adquisición del fenotipo maduro de los preadipocitos; esto se debe gracias al cambio en la expresión de un variado número de genes, unos activando diferentes vías y otros inhibiéndolas. Toda esta orquesta de represiones y activaciones génicas se realiza gracias, entre otras cosas, a un grupo de factores de transcripción específicos de este proceso, siendo de los más estudiados aquellos que pertenecen a la familia C/EBP y a PPAR $\gamma$ .

La regulación de la diferenciación del adipocito es un importante proceso muy complejo que controla el desarrollo del tejido adiposo. Durante la diferenciación, el adipocito adquiere su fenotipo por cambios en la expresión de un gran número de genes como la lipoproteína lipasa (LPL), la proteína transportadora de ácidos grasos (FATP), la proteína de unión a ácidos grasos (aP2), la acil-CoA sintetasa (ACS), la fosfoenolpiruvato carboxi-quinasa (PEPCK), la enzima málico deshidrogenasa o UCP2, que provoca un aumento en su expresión gracias al efecto principalmente de unos factores de transcripción tales como PPAR- $\gamma$ , la familia de proteínas de unión al incrementador CCAAT [38] y el factor 1 de diferenciación y determinación del adipocito/proteína de unión al elemento regulador por esteroides-1 (ADD1/SREBP-1) [39-42].

Dos proteínas de la familia de los C/EBP (CCAAT-enhancer-binding protein), más concretamente,  $\delta$  y  $\beta$  son los primeros factores de transcripción activos que intervienen en la diferenciación. De hecho, los niveles máximos de expresión de dichos factores se concentran en los primeros días, por lo que se cree que se encargan de dirigir la maduración. La actividad de dichos genes se piensa que están muy relacionados con el control de expresión de PPAR- $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor) y de C/EBP $\alpha$ , que son los factores de transcripción más importantes en este proceso y que, cooperando entre ellos, van a activar multitud de genes implicados en la diferenciación de los adipocitos, que van desde el metabolismo lipídico hasta la secreción de adipocinas; por lo que una vez que los niveles de C/EBP  $\delta$  y  $\beta$  comiencen a disminuir será cuando, tanto PPAR- $\gamma$  como C/EBP $\alpha$ , tomen la iniciativa y el protagonismo creando y manteniendo el fenotipo maduro [43] (Figura 10).

### 3.1 FASES EN LA DIFERENCIACIÓN

Las fases por las que pasa un adipocito en su diferenciación son cuatro: detención del crecimiento, expansión clonal, cambios en la expresión de genes y estadio final de la diferenciación.

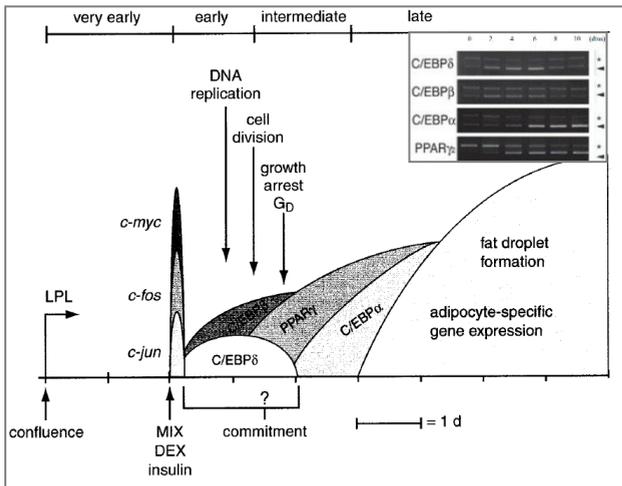


Figura 10. Progresión de la diferenciación de los preadipocitos 3T3-L1. Los mayores eventos identificados son presentados cronológicamente. Adaptado de Ntambi et al. 2012.

#### Detención del crecimiento

Es el primero de los pasos a seguir para una correcta diferenciación del adipocito y, aunque es habitual llevar las células a una confluencia para que exista contacto entre ellas (fase G1), este paso no es imprescindible. Además se ha visto en líneas celulares preadiposas y en cultivos de preadipocitos primarios de rata que, aunque la confluencia conduce a la parada del crecimiento, no se requiere el contacto entre células para la conversión del adipocito [44].

Después de la confluencia celular, para poder diferenciar nuestra línea celular 3T3-L1 se necesita un cóctel de inductores como la insulina a dosis altas [45] o dexametasona, así como un agente para elevar los niveles de AMPc intracelular, el IBMX, que es un inhibidor de la enzima fosfodiesterasa, que degrada dicho AMPc. Esta inducción inicia una serie de eventos que regulan positivamente el programa de diferenciación.

En esta fase existen factores de transcripción, como veremos más adelante, que transactivan genes específicos de adipocitos: el tipo  $\delta$  y  $\beta$  de la familia de proteínas C/EBP que están implicadas en la parada del crecimiento y son requeridas por el adipocito para comenzar su diferenciación [46].

## **Expansión clonal**

Siguiendo con la inducción de diferenciación (en fase G1) los preadipocitos entran en ciclo celular y llevan a cabo alrededor de dos rondas de división mitótica (expansión clonal); este paso, al contrario que el anterior, es imprescindible para el desarrollo del programa de diferenciación del adipocito.

Para comprender mejor todo esto se muestra la Figura 11, donde se observa cómo a los 5 minutos de la inducción de la diferenciación existe una proteína llamada CREB (AMPC response element-binding protein) que es fosforilada provocando un aumento de la expresión de C/EBP  $\beta$  cuya capacidad de unión al ADN está inactiva, por ahora. Decir también que esta proteína CREB es fosforilada por la proteína quinasa A, que es activada por AMPc [47-49].

Continuando con lo anterior, a las 14-16 horas de la inducción, C/EBP  $\beta$  adquiere dicha capacidad de unión al ADN y las células entran en ciclo celular. Después, entre las 16-20 horas post-inducción, los marcadores de ciclo celular de la fase S entran a escena y lo hacen de una forma sincrónica, coincidiendo con el inicio de la replicación [50,51]. Ahora es cuando la proteína GSK3 $\beta$  fosforila a C/EBP  $\beta$  (Figura 11) coincidiendo con el límite G1/S.

Por otro lado, se debe mencionar que la expresión de la histona H4 aumenta entre 12-14 horas después de la inducción, justo antes de entrar en la fase S, coincidiendo con la ganancia de función de C/EBP- $\beta$ .

En esta última parte de esta fase (sobre las 16-24 horas después de la inducción) los preadipocitos entran sincrónicamente en ciclo celular [52,53] y llevan a cabo varias rondas de mitosis (al menos un ciclo de

replicación del ADN y duplicación celular, etapa comúnmente llamada: *expansión clonal mitótica*).

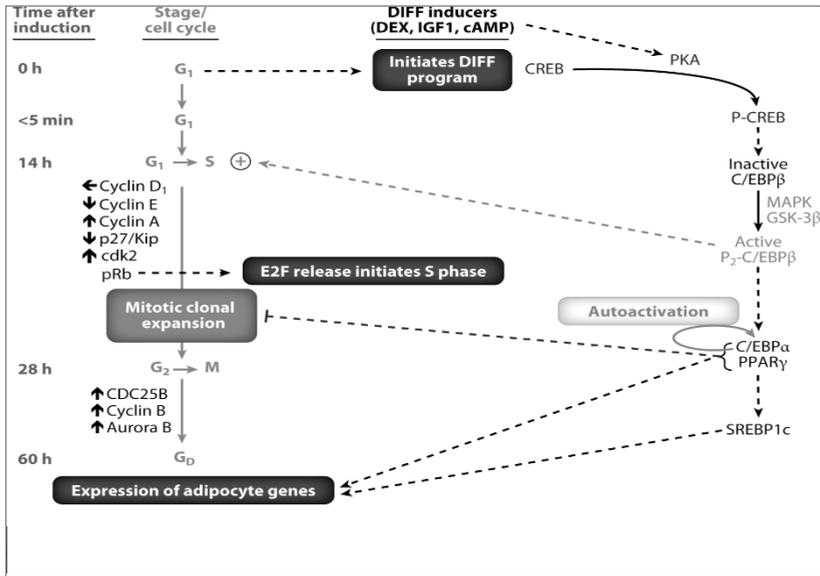


Figura 11: Programa de diferenciación del adipocito. Adaptado de Tang et al. 2012.

## Cambios en la expresión de genes o cascada de factores de transcripción

Como vemos, la detención del crecimiento y la expansión clonal van acompañados de complejos cambios en el patrón de expresión de genes, que pueden variar de un tipo de cultivo celular a otro o depender del protocolo de diferenciación utilizado. El siguiente paso que se observa es el momento donde la célula comienza a activar todos los genes implicados en la formación del adipocito maduro.

En este momento se observa como CREB, ya comentada anteriormente en la activación de C/EBP-β, es activada por el aumento de los niveles de AMPc. Esto parece ayudar a desencadenar todos estos cambios de expresión génica. De hecho, todos los modelos de diferenciación conocidos para estas células, llevan consigo diferentes agentes, como lo son el IBMX y la dexametasona, que provocan esto mismo actuando a diferentes niveles.

## **Estadio final de la diferenciación**

Por último y gracias a todos estos cambios comentados anteriormente el adipocito va aumentando su contenido en lípidos y se hace sensible a la insulina. También se produce un incremento dramático de los niveles de proteína y ARNm de todas aquellas enzimas implicadas en el metabolismo de los triglicéridos [54], así como aumenta el número de transportadores de glucosa [55] y de receptores de insulina. Por otra parte también es digno de mencionar que los receptores  $\beta$ 1-adrenérgicos, asociados a promover lipólisis en adipocitos, disminuyen con la diferenciación mientras que los  $\beta$ 2 y  $\beta$ 3 sufren un aumento de su número [56].

### **3.2 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN**

Aunque ya hemos comentado diversas funciones de estas proteínas encargadas de desencadenar la diferenciación, para una mejor comprensión de este trabajo, se detalla a continuación más acciones conocidas de cada uno de los miembros de estas familias de proteínas:

#### **Proteína de unión al incrementador CCAAT (C/EBP)**

Todo comenzó con C/EBP $\alpha$ , que fue la primera de las isoformas conocidas que se clonó y se estudió en adipogénesis. Después se empezaron a descubrir otras isoformas implicadas, de las cuales 2 de ellas tienen capacidad de unión al ADN, la isoforma  $\beta$  y la  $\delta$ . Y también existe otra isoforma denominada CHOP10 que posee el dominio de unión a ADN más pequeño y no funcional.

Se comenta a continuación cada una de estas proteínas por orden de aparición en el proceso:

#### **- C/EBP $\beta$ y $\delta$**

No existen muchos estudios centrados exclusivamente en C/EBP  $\delta$ , sin duda es la isoforma menos conocida de toda la familia. Así, la gran

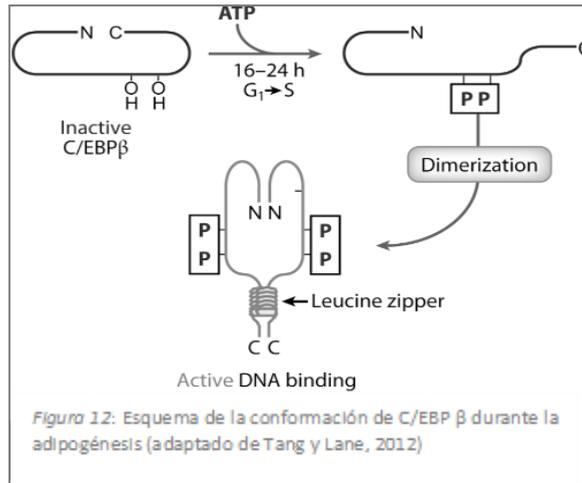
mayoría de artículos en adipogénesis encontrados nos muestran información conjunta con la forma  $\beta$ .

Como ya comentamos en este capítulo, C/EBP  $\beta$  y  $\delta$  son isoformas que se expresan al principio de la inducción a la diferenciación (menos de 4 horas) [57] expresándose antes que PPAR $\gamma$  y C/EBP $\alpha$ . Esto sugiere un control de la expresión de C/EBP $\alpha$  por parte de estas isoformas beta y delta [57,58]. De hecho se ha demostrado que la expresión ectópica de dichas isoformas en preadipocitos 3T3-L1 induce la expresión de C/EBP $\alpha$ ; e incluso se propone que puedan controlar también la expresión de PPAR $\gamma$ .

Además se conoce que ambas son capaces de promover la adipogénesis cuando se sobreexpresa en preadipocitos (en las líneas celulares 3T3-L1 o NH3-3T3) en ausencia de hormonas inductoras [59]. También es necesaria para la diferenciación del adipocito en cultivos celulares [50,51,60,61] y coordina la expresión de PPAR $\gamma_2$  y C/EBP $\alpha$  a través de los elementos reguladores de las regiones próximas al promotor de dichos genes [50,62,63].

Con respecto a C/EBP- $\delta$  hay estudios que mostraron cómo en ratones KO [38] se observa poco efecto sobre la acumulación del tejido adiposo; aunque el doble KO ( $\beta$  y  $\delta$ ) [38] sí presenta una marcada disminución. Esta reducción bien podría deberse a la disminución en el número de células, viendo las funciones de C/EBP $\beta$  en la expansión clonal mitótica [60]. Por lo tanto ambos factores de transcripción parece que son necesarios para una correcta evolución de la diferenciación del adipocito, sin embargo poco se conoce de la forma  $\delta$ , sobre cómo podría actuar, aunque parece que ejerce una función determinante en la fase de “expansión clonal mitótica”, activando genes cruciales para una correcta diferenciación [64].

Acerca de C/EBP- $\beta$  sí que existen más estudios sobre cómo actúa en estas primeras etapas, como hemos descrito anteriormente. Así dicha proteína está en su forma inactiva (sin unión a ADN) y es a partir de las 16 horas, aproximadamente, después de la inducción del proceso, cuando parece activarse al mismo tiempo que se entra en la fase S de la expansión clonal mitótica (Figura 12).



Todo esto está regulado por diferentes fosforilaciones que hacen que se adquiera capacidad de unión al ADN. Estas fosforilaciones se producen de forma secuencial, primero por MAPK y mucho después por GSK-3 $\beta$ . La fosforilación en Thr188 por MAPK ocurre a las 4 horas desde la inducción de la diferenciación y aunque es necesaria para la unión al ADN de la proteína en cuestión, es insuficiente para que C/EBP $\beta$  adquiera una total función de unión. Ya que necesita de la fosforilación por GSK (a las 14 horas aprox. después de la inducción) en Thr179 o Ser184 para que adquiera una función completa [61] (Figura 11).

### - C/EBP $\alpha$

Es el factor de transcripción que forma, junto con PPAR $\gamma$ , la pareja con un papel crucial en la diferenciación del adipocito; de hecho una expresión forzada de C/EBP $\alpha$  o PPAR $\gamma$  en los preadipocitos 3T3-L1 induce adipogénesis en ausencia de inducción hormonal [65-67].

C/EBP $\alpha$  y PPAR $\gamma$  ejercen su función como activadores pleiotrópicos transcripcionales de una larga lista de genes proadipogénicos. Una vez expresado, se piensa que C/EBP $\alpha$  mantiene la expresión tanto de ella misma como de PPAR $\gamma$  a través de los elementos reguladores C/EBP [68-71] y que dichos elementos pueden actuar a nivel de promotores de muchos genes, hecho que se produce a partir de las 16-20 horas. Además cuando interviene junto a PPAR $\gamma_2$  (Figura 13) se

activan mutuamente a nivel de sus respectivos elementos reguladores [72-74].

Para estudiar la importancia de estos factores de transcripción se generaron ratones KO para C/EBP $\alpha$  y se encontraron con una disminución en la capacidad de diferenciación adipocitaria [75] y unos niveles de expresión bajos de PPAR $\gamma$ . Cuando se repuso PPAR $\gamma$ , por transferencia retroviral, los fibroblastos de ratón se diferenciaban bien, sugiriendo que C/EBP $\alpha$  induce la expresión de PPAR $\gamma$ . Además una expresión ectópica de PPAR $\gamma$  en células C/EBP $\alpha$  KO [4] provoca una diferenciación normal, a niveles de acumulación lipídica y de la mayoría de genes expresados. También es interesante comentar de este estudio que dichas células no son sensibles a la insulina, una deficiencia que puede ser restaurada añadiendo C/EBP $\alpha$ . La razón de esto puede ser explicada en parte por una disminuida expresión del receptor de insulina y de IRS-1 en estas células. Además vieron que existía una localización anormal de Glut4. Esto mismo se estudió en la línea celular NIH-3T3 con el mismo resultado: consiguen la diferenciación en adipocitos con una disminuida sensibilidad a la insulina, hasta que se añada C/EBP $\alpha$ .

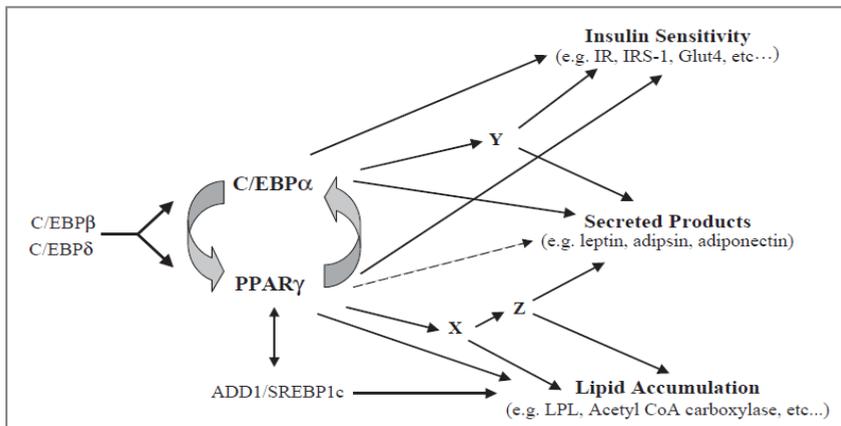


Figura 13: Adaptado de E.D. Rosen, *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 73,

### - Receptor Activado por el Proliferador de Peroxisomas $\gamma$ (PPAR- $\gamma$ )

PPAR $\gamma$  forman parte de una subfamilia de receptores nucleares para hormonas esteroideas y tiroideas tales como el ácido retinoico y la vitamina D. Parece actuar como un regulador fundamental en el programa de lipogénesis, como C/EBP $\alpha$ , aunque también participa en otros sistemas diferentes, como la adipogénesis en el hígado [76].

Existen tres isoformas de esta familia de factores de transcripción,  $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  y  $\gamma$  que están codificados por genes distintos. El subtipo de PPAR mejor caracterizado ha sido el  $\gamma$  que a su vez consta de tres isoformas distintas. Los transcritos vienen del mismo gen a través de splicing alternativos, siendo PPAR $\gamma_2$  la isoforma específica del adipocito (a partir de ahora la nombraré solo como PPAR $\gamma$ ). Se conocen pocos ligandos para PPAR $\gamma$ , como por ejemplo los thiazolidinedionas sintéticos (TZD, que se utilizan como drogas antidiabéticas "in vivo") o los prostanoides aumentando la sensibilidad frente a la insulina.

Con respecto a la estructura de estos receptores vemos una secuencia altamente conservada de unión al ADN que consiste en una estructura de "dedos de zinc". También hay un alto grado de conservación entre los distintos tipos de PPAR y el receptor de triyodotironina en la secuencia de unión al ligando. La familia PPAR necesita formar un heterodímero para poder unirse al ADN en una secuencia específica denominada "Elemento de Respuesta a Proliferadores de Peroxisomas" [77].

PPAR $\gamma$  se expresa de forma más abundante en tejido adiposo e intestino delgado [78,79]. Además ve inducida su transcripción antes de la activación transcripcional de la mayoría de los genes del adipocito, como la lipoproteína lipasa (LPL), la proteína transportadora de ácidos grasos (FATP), la proteína de unión a ácidos grasos del adipocito aP2, la acil-CoA sintetasa (ACS), la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), la enzima málico deshidrogenasa y UCP2 [80]. Este conjunto de genes implican a PPAR $\gamma$  en la estimulación de pasos clave en la acumulación lipídica, de acuerdo con su función de factor diferenciador de los adipocitos.

También es conocida que la expresión de PPAR $\gamma$  es suficiente para detener el crecimiento en un cultivo de fibroblastos en fase exponencial y comenzar la adipogénesis [81]. Además la expresión ectópica de PPAR $\gamma$  en fibroblastos no adipogénicos activa la expresión de genes de diferenciación adipocitaria [76,82,83]. También se sabe que ratones KO de este gen bloquean esta función [72,84] por lo que su importancia en el proceso de la diferenciación queda patente.

Algunos de los genes que ven activada su expresión en el adipocito por PPAR $\gamma$  son los de las proteínas desacoplantes de la fosforilación oxidativa (UCPs). Estas proteínas son transportadores mitocondriales capaces de disipar un gradiente de protones e incrementar la termogénesis mientras reducen la eficiencia de la síntesis de ATP. Existen tres isoformas, pero es la UCP2 la más específica de tejido adiposo blanco. La regulación de la oxidación de ácidos grasos y glucosa y la reducción de la producción de especies de oxígeno reactivas son otros papeles fisiológicos que se le atribuyen a esta proteína [85]. También es interesante saber que UCP2 está implicada en la regulación del metabolismo energético, así en roedores resistentes a obesidad la expresión de UCP2 se ve incrementada 2 veces comparada con la de animales con tendencia a la obesidad [86].

Aparte de las dos familias de factores de transcripción aquí estudiadas existen otros que también participan y que, de una u otra forma, actúan a diferentes niveles del proceso. Quizás el más estudiado sea el “Factor 1 de diferenciación y determinación del adipocito/proteína de unión al elemento regulador por esteroides-1” (ADD1/SREBP-1c) que está implicado en el metabolismo del colesterol y que puede participar también en la expresión de genes del adipocito [87]. La coexpresión de ADD1/SREBP1 con PPAR $\gamma$  incrementa la actividad transcripcional de este último incluso sin la adición de sus ligandos [88]. Juega un papel fundamental en varios aspectos del desarrollo del adipocito, incluyendo la inducción de PPAR $\gamma$ , la generación de ligandos endógenos para PPAR y la expresión de genes vitales en la biosíntesis de lípidos.

Pero al igual que PPAR $\gamma$ , ADD1/SREBP1 no se limita únicamente a su papel como factor diferenciador, sino que ambos tienen un papel funcional en el control del metabolismo energético en el tejido adiposo. Así, estudios hechos en mujeres obesas que sufrieron una

pequeña pérdida de peso indican que en el tejido adiposo se produjo una disminución en el ARNm de ADD1/SREBP1 y PPAR $\gamma$  [89].

## 4. SAM68

Sam68, sustrato de Src (oncogén del virus del sarcoma de Rous) en mitosis, es una proteína STAR (transductor de señales y activador del metabolismo de ARN) [90,91], implicada en la transducción de señales y la activación del metabolismo del ARN a través de su dominio de homología KH (homología a hnRNP) [92-94]. Es una proteína con multitud de dominios para interactuar como adaptador entre las rutas de señalización y el procesamiento del ARN (Figura 14).

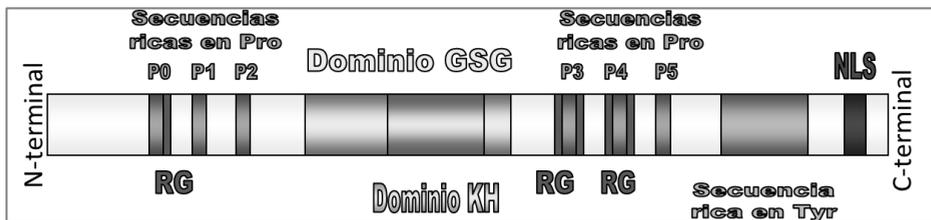


Figura 14: Esquema de la estructura funcional de Sam68

### 4.1 DOMINIOS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES

Sam68 es una proteína muy rica estructuralmente, con diferentes dominios que le van a llevar a interactuar con muchas proteínas de diversas rutas metabólicas, así como de unión a muchos tipos de ARN, que le confieren una capacidad muy alta de intervención en diferentes sistemas celulares, tal y como veremos más adelante. A continuación detallamos los diferentes dominios estudiados hasta la fecha:

## Dominio GSG (también conocido como dominio STAR)

Es el dominio que permite a Sam68 la interacción o unión a ARN [95]. Comprende un tamaño de unos 200 aminoácidos. Como se puede observar en la Figura 16 este dominio está formado por 3 estructuras claramente diferenciadas: una zona central de unos 70 aminoácidos llamada KH, denominado así por su homología a la ribonucleoproteína heteronuclear K [96] que se encuentra flanqueado por secuencias amino (NK) y carboxi-terminal (CK) que son necesarias para esta actividad de unión a ARN, [97,98]. Este dominio también se presenta en proteínas no STAR, y a veces conteniendo varios dominios KH en la misma proteína, como por ejemplo la proteína FMR1 producto del gen X frágil humano con dos dominios KH [99,100] comprendiendo que la presencia de varias copias del dominio KH en una proteína es una señal de que se une a ARN como multímero.

La Figura 15 muestra la estructura tridimensional del dominio, donde se observa cómo la lámina  $\beta 1$  y  $\beta 2$  son adyacentes y paralelas, y  $\beta'$  es adyacente y antiparalela a la lámina  $\beta 1$ . Se dispone en una estructura en forma de sándwich abierto con los residuos alifáticos formando el centro hidrofóbico de la misma [101,102]. En la estructura, se distinguen 4 bucles. El primero está localizado entre  $\beta 1$  y  $\alpha 1$ . Además, todos los dominios KH presentan un lazo invariante GXXG [103] entre  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ , que forma el segundo bucle. El tercer y cuarto bucle se localiza entre  $\alpha 2$ - $\beta 2$  y  $\beta 2$ - $\beta'$  respectivamente.

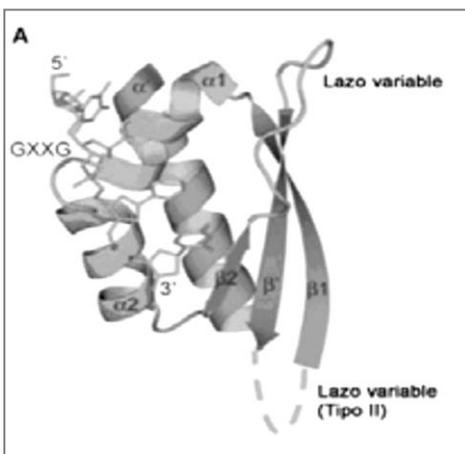


Figura 15: Estructura tridimensional del dominio KH.

Por su motivo KH, Sam68 se une a homopolímeros de ribonucleótidos, tanto ARN como ADN de cadena sencilla [104], con una alta afinidad a poli-U [105] y poli-A [106]. Además existe una isoforma sin dominio KH de Sam68 que es expresada en la detección del crecimiento por confluencia [107].

Existen numerosos ARN mensajeros que se han descubierto que interactúan con Sam68 o con complejos proteicos asociados en células NIH3T3 [108], como por ejemplo hnRNP A2/B1 y  $\beta$ -actina. Las secuencias de unión corresponden a los nucleótidos UAAA y UUUUUU, respectivamente. No obstante, permanece sin determinar si Sam68 se une a sitios no definidos en el ARNm.

Además de ARNm, también se ha demostrado que Sam68 se une a la secuencia de ARN RRE, el elemento de respuesta a Rev, una proteína expresada en la fase de replicación del VIH [109].

Hay estudios que demuestran que las proteínas STAR forman homomultímeros a través de este dominio GSG [106]; así como también existen evidencias de formación de heteromultímeros debido a la similitud de secuencias de este mismo dominio GSG [110]. Además hay algunos estudios que muestran la necesidad de dimerización para que algunas proteínas de esta familia (STAR) puedan tener la capacidad de unión a ARN [106].

### **Regiones ricas en prolina. Dominio SH3**

Las proteínas STAR, y más concretamente Sam68, contienen varias secuencias ricas en prolina que son sitios de unión de las proteínas que contienen dominios SH3 (Src homology 3) y WW (dominios conservados de dos triptófanos). De hecho Sam68 contiene 6 de estas regiones fuera de la región GSG: tres en N-term (P0-P2) y tres en C-term (P3-P5) [104]. Además estas secuencias ricas en prolina contienen las secuencias consenso PXXP que son las que reconocen los dominios SH3.

Algunos ejemplos de proteínas con dominios SH3 que interactúan con Sam68: Src [105,111], Sik/BRK [112], con p85 PI3K [113], PLC-1 [111,114], PRMT2 [115], Grb-2 [116,117], Grap [116], Itk/Tec/BTK [118,119], Vav [120] y Nck [121].

Con respecto al dominio WW se sabe que comprende una secuencia conservada de 40 aminoácidos repetitivos. Los dominios WW y los dominios SH3 tienen afinidad por secuencias ricas en prolina similares o solapadas, y es concebible que puedan competir por los mismos

ligandos in vivo [115,122]. Así proteínas con dominio WW como FBP21 y FBP30 (Formina Binding Protein) interaccionan con Sam68. La metilación en arginina de Sam68, regula negativamente las interacciones con los dominios SH3, pero no las de WW. Éste puede ser el mecanismo que también puede regular las funciones citoplasmáticas y nucleares de la proteína en relación a la unión a dominios SH3 [123].

### **Regiones ricas en tirosina. Fosforilaciones. Dominio SH2**

Sam68 contiene 16 tirosinas conocidas capaces de ser fosforiladas. Cuando se produce dicha fosforilación se produce una estructura capaz de interaccionar con motivos SH2 de diversas proteínas. Se conocen varias de estas proteínas quinasas capaces de fosforilar a dichos residuos, la primera que se conoció fue Src, que durante la mitosis, forma primero una unión entre su dominio SH3 y la región de poliprolina, para después interaccionar mediante su dominio SH2 con una región específica fosforilada de Sam68 [93,105]. Otras quinasas, dignas de mención, capaces de interactuar con Sam68 conocidas son: p59fyn [111], p56lck [124], ZAP-70 [125] y Sik/BRK [112]. También algunos receptores de membrana, como el receptor de insulina, inducen la tirosín fosforilación de Sam68 [126].

Una vez fosforilada en tirosina permite la interacción con otras proteínas que presenten dominios SH2. Hay estudios que muestran cómo muchas de las quinasas que fosforilan a Sam68 tienen estos motivos estructurales SH2 que permiten una nueva interacción entre ellas una vez fosforilada [127]; entre las que destacamos: incluyendo la familia de quinasas Src [93,105,111,124], Sik/BRK [112] y las quinasas de la familia Itk/Tec [119,128]. También otras proteínas adaptadoras como Grb2 [111,116], Grap [116], Nck [129], PLC-1 [111], Ras-GAP [111] y p85-PI3K [113,126,130].

Todas estas observaciones son consistentes con la hipótesis de que Sam68 funcione como una proteína adaptadora. También se ha visto que la fosforilación en la zona C-terminal, en concreto la tirosina 440, es requerida para la correcta localización celular de Sam68 [131].

## Señal de localización nuclear

Sam68 contiene una señal de localización nuclear no convencional (NLS), la cual se encuentra en los últimos 24 aminoácidos del extremo carboxiterminal [132]. La diferencia con respecto a la señal de localización nuclear convencional radica en la posición de varios residuos básicos en la secuencia y en la presencia de dos motivos concretos de localización nuclear: PPXXR [132] y RXHPYQ/GR [75].

Aunque Sam68 contenga esta señal en su estructura se conocen muchos casos en los que su localización es citoplasmática, como por ejemplo en la línea celular HTC-IR (Hepatoma de rata sobreexpresando el receptor de insulina) o en otras células diana de la insulina como son los adipocitos [133]. Además se han estudiado la interacción con varios ARN mensajeros durante la traducción [134] y su función de transporte de ARN viral, con lo que nos lleva a pensar en una localización citosólica necesaria [135].

## Dominio rico en Arginina-Glicina. Metilaciones.

Otra de las características que se encuentran en la estructura de Sam68, y de otras proteínas STAR, es el dominio rico en arginina-glicina (RG) y el dominio arginina-glicina-glicina (RGG). Estas zonas van a ser potenciales sitios de metilaciones, que son modificaciones covalentes postraduccionales importantes en la modulación de algunos procesos celulares como la transcripción o las interacciones proteína-proteína, entre otras [136-138]. A diferencia de la fosforilación en tirosina, la metilación es un modo de regulación menos rápido que provoca una disminución de la actividad de unión a poli-U de Sam68 y proteínas SLM [139]. En las proteínas STAR podemos encontrar varias secuencias ricas en RG y RGG, potenciales de metilaciones [95].

La principal enzima que cataliza la metilación de Sam68 *in vivo* se conoce como PRMT-1 [140]. Además Sam68 se encuentra hipometilado en el citoplasma [140] lo que hace pensar en una posible función de la metilación como regulación de la maduración y localización de Sam68.

## Otras modificaciones postraduccionales de Sam68

- Fosforilación en Serina y Treonina: Sam68 se fosforila, principalmente por CDK1, en residuos Serina durante la progresión del ciclo celular en las fases G1 y S; mientras que en la fase G2/M se fosforila en residuos Treonina [141].
- Acetilación: es una modificación postraducciona sobre residuos de lisina irreversible que ayuda en la capacidad de unión de proteínas con el ADN [142]. Sam68 es acetilado in vivo tanto dentro como fuera de su dominio CSG.
- Sumoilación: se conoce que la lisina 96, en el extremo aminoterminal, es el principal punto aceptor de Small ubiquitin-like modifier [143]. Para que esto se produzca se necesitan una secuencia consenso y una señal de localización nuclear y lo que conllevaría es un incremento en la capacidad de Sam68 para inhibir la expresión de la ciclina D1 [143].

## 4.2 GENÉTICA

El gen humano de Sam68 (Figura 16) se encuentra en el cromosoma 1p32, contiene 30834 pares de bases y 9 exones con tamaños todos similares a los del gen de ratón [144]. Con respecto a su expresión sabemos que Sam68 se expresa de manera ubicua en el organismo, aunque los niveles de expresión de un tejido con respecto a otro varían [104].



Figura 16: Estructura genómica de Sam68.

### 4.3 FUNCIONES BIOLÓGICAS DE SAM68

La primera vez que se identificó a Sam68 fue en células transformadas con oncogenes de la familia de V-Src. Luego se supo que era un sustrato de Src en mitosis con capacidad de unión a ARN con un peso, en gel de poliacrilamida (PAGE) de 68 KDa [93,111,145].

Al irse conociendo cada una de las particularidades de esta proteína: la capacidad de unión a ARN, sus diferentes motivos estructurales, etc... se proponen muchas funciones diferentes donde Sam68 podría participar; como la regulación de la expresión génica, splicing alternativo, señalización, ciclo celular, exportación de ARN, implicado en la traducción de proteínas, además de su actuación en diferentes sistemas celulares tales como la apoptosis, infecciones víricas, procesos oncogénicos, etc...

#### Mitosis y regulación del ciclo celular

Src es una quinasa vital en el ciclo celular, se activa durante la mitosis en un proceso de dos pasos (Figura 17). Se observa cómo la proteína se mantiene inactiva cuando se encuentra fosforilada en Y530, esto provoca que el dominio de unión a proteínas SH2, quede oculto [146,147]. En el otro caso, cuando se desfosforila este residuo, provoca la exposición del dominio SH2 para que se pueda producir una interacción con el complejo Cdc2/ciclina B y conlleve a una nueva fosforilación, esta vez en Y419, que promueve la actividad quinasa y la asociación con moléculas sustrato.

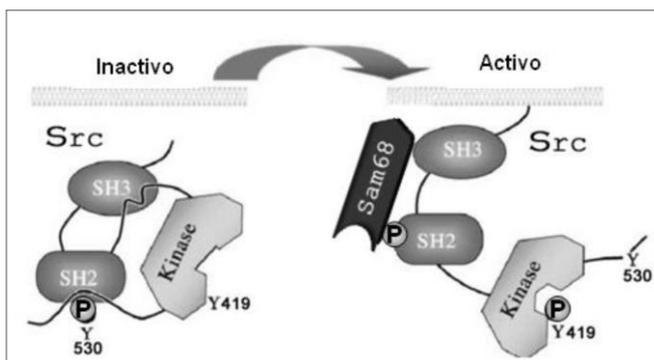


Figura 17: Activación de Src por fosforilación en Tyr-419.

Sam68 interacciona con Src a través de una región poliprolina del dominio SH3 para poder ser fosforilada, además de hacerlo con otras quinasas y presentando un papel controvertido en el ciclo celular, según diversos estudios hasta la fecha:

- Cuando se inhibe la fosforilación en tirosina por Src sobre Sam68, se bloquea la salida de mitosis en fibroblastos, sin afectar a la entrada en mitosis [148].

- La quinasa CDK1 se asocia a Sam68 y lo fosforila en residuos treonina in vivo e in vitro sugiriendo que Sam68 pudiera mediar algunos efectos biológicos durante la mitosis modulando su capacidad de unión a ARN poli U [141].

- Existe una variante natural de Sam68 sin capacidad de unión a ARN ( $\Delta$ -KHSam68) con una delección del dominio KH que provoca una inhibición en la transición de las fases G1/S. Esta isoforma presenta una capacidad de unión a ARN menor y su expresión, que suele ser durante la etapa G0, puede inhibir la síntesis de ADN [149]. También es conocida que dicha variante en células NIH3T3 regula de forma negativa la expresión de la ciclina D1 provocando la inhibición en la entrada desde la fase G1 a la S, siendo revertido por la forma completa de Sam68, lo que sugiere una función de Sam68 de beneficio en la proliferación celular [149]. Aunque también hay estudios que sobreexpresaron Sam68 mutado en la región KH y observaron que se bloqueaba la progresión de la fase G1 disminuyendo también la expresión de la ciclina D1. Esto sugería justo lo contrario que en anterior caso: que el bloqueo del ciclo celular por Sam68 sea independiente de su capacidad de unión a ARN [150].

## **Transducción de señales**

Sam68, como hemos nombrado anteriormente, contiene varios dominios capaces de interactuar con muchas proteínas diferentes. Con respecto a la interacción con dominios SH2 de proteínas de señalización se conocen varios ejemplos: así pues cuando Sam68 es fosforilado en tirosina reconoce al dominio SH2 del extremo N-terminal de p85 y se une a él con mayor afinidad que con el dominio SH2 C-terminal [126]. O

como también existe una preferencia por la unión al dominio SH2 del extremo C-terminal de GAP en vez del extremo N-terminal [133].

También existe una interacción de Sam68 con otras proteínas de señalización, aunque a través de otros dominios; como la región poliprolina de Sam68 interactúa con dominios SH3 de proteínas de la familia de Src [105,111], Sik/BRK [112], Fyn [111], Itk/Tec/BTK [128], Lck [151], Csk [152], todas ellas permiten su fosforilación en residuos de tirosina. Además también interacciona con dominios SH3 de varias enzimas de señalización y proteínas adaptadoras: p85 PI3K [113], PLC-1 [111,114], PRMT2 [115], Grb-2 [116,117], Grap [116], NcK [129], o Vav [120].

La unión de Sam68 a los dominios SH3, regula negativamente la actividad de unión al ARN, como se ha visto en Fyn [113] así como la fosforilación en tirosina de Sam68 regula negativamente la capacidad de unión a ARN *in vitro* [149,153], lo que puede representar un enlace importante entre metabolismo de ARN y la transducción de señales, ya que cada vez se conocen más casos de rutas de señalización donde participa Sam68; entre los casos más importantes destacamos:

### **Sam68 y el receptor de insulina**

Una de las funciones estudiadas por nuestro grupo en los últimos años comprende la participación de Sam68 en la ruta de la insulina; con lo que se propuso a Sam68 como sustrato del receptor de insulina [126]. Estimulando células HTC (hepatoma de rata) que sobreexpresan el receptor de insulina se promueve la fosforilación de Sam68 de forma dependiente de la dosis [126]. El mismo resultado se obtuvo al hacerlo en la línea celular CHO (chinese hamster ovary) sobreexpresando el receptor de insulina también; o con sistemas más fisiológicos como lo es el adipocito de rata [154]. Además existe un aumento en la expresión de Sam68 ante el estímulo de insulina [133,154].

También se ha propuesto que Sam68 es fosforilado en tirosina por el receptor de insulina formando varios complejos ternarios en respuesta a insulina, como se ha visto que se asocia con el dominio SH2 N-terminal de uno de los sustratos del receptor de insulina, p85 de PI3K [133], que a

su vez utilizaría el SH2 C-terminal para su asociación al sustrato 1 del receptor de insulina (IRS-1), provocando un aumento en la actividad de PI3K [155].

Otra de las interacciones conocidas es aquella que se produce con RAS-GAP en mitosis [156] con lo que proporcionaría un punto de unión o enlace entre las rutas PI3K y RAS-MAPK [133]. También es conocida la posible interacción simultánea entre Grb2-SOS-Sam68 pudiendo formar un complejo con GAP e incrementando la actividad de intercambio de GDP/GTP de Ras.

Todo esto, junto con la relocalización de Sam68 en el citoplasma tanto en adipocitos como en la línea celular HTC-IR, dejan claro que Sam68 participa en diversas funciones de señalización en respuesta a insulina.

Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que Sam68 media la acción de la insulina en células de cáncer de mama, en parte induciendo la expresión de IRS-1 [157].

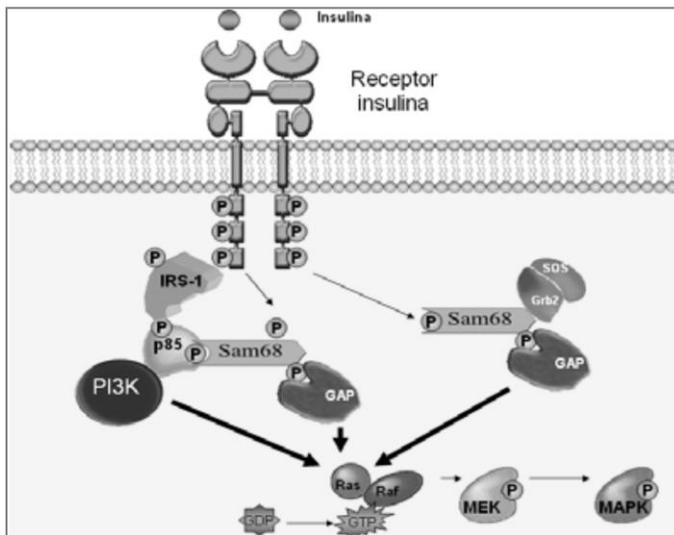


Figura 18: Esquema de la participación de Sam68 en la vía de la insulina.

## Sam68 y el sistema inmune

### - Receptor de leptina:

Sam68 parece participar también en la señalización celular a través del receptor de leptina tanto en monocitos como en linfocitos humanos [158]. Se sabe que las quinasas de la familia Janus (JAKs) asociadas al receptor, inician la señalización ante estímulo de leptina. Estas proteínas se autofosforilan y fosforilan a proteínas de la familia STAT (signal transducers and activators of transcription), que dimerizan y se translocan al núcleo, donde activan determinados genes [159]. La leptina humana es capaz de estimular la fosforilación de Sam68 a través de su receptor en células trofoblásticas [160]. Esta fosforilación en tirosina de Sam68 también se estudió en células mononucleares ante estímulo de leptina, inhibiendo la eficiencia de unión de Sam68 a Poli U [130], que puede estar implicado en una regulación rápida a nivel postranscripcional del ARN (Figura 19).

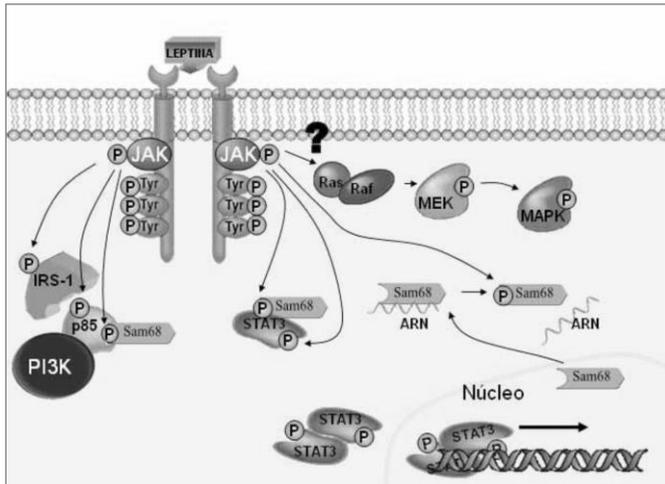


Figura 19: Esquema de la participación de Sam68 en la señalización del receptor de leptina.

### - Receptor de linfocitos T [125]

La vía de señalización del receptor de linfocitos conduce a una activación en cadena de varias familias de quinasas como son Src, Lck y Fyn. Muchas de estas enzimas pueden interaccionar con Sam68 a través de los dominios SH3 permitiendo la fosforilación en tirosina de Sam68. También ZAP-70 fosforila a Sam68 en células Jurkat [125]. Esta fosforilación, promueve la asociación de Sam68 con varias proteínas de señalización a través de los dominios SH2, como PLC-1, p120GAP [161,162], p85 PI3K, Grb2, SHP-1, Cbl y JAK3 [163]. Además Sam68 también media la acción de los receptores *toll-like*, en especial TLR-2 y TLR-3 [164] y en la señalización del receptor de angiotensina II [165].

### **Sam68 y el procesamiento del ARN**

Sam68 extiende su radio de acción también en el procesamiento del ARN, y se comporta como un adaptador funcional capaz de unir vías de señalización además de participar en la regulación génica pre y post-traduccionales. En los genes existe una región rica en AU (región 3'-UTR) que es una región no traducida en 3', que parece ser una diana de Sam68. Además encontramos estudios realizados sobre diferentes virus en los cuales Sam68 parece estar implicado en modular la exportación nuclear y la utilización citoplásmica de ARN viral [135,140]. Además con respecto a procesos post-traduccionales se ha llegado a demostrar también un papel directo en la traducción proteica en determinados procesos [134,166].

Además todas las modificaciones postraduccionales parecen regular tanto la localización de Sam68 como la accesibilidad al ARN. Fosforilaciones en tirosina parecen disminuir la capacidad de unión a ARN, como hemos descrito anteriormente, o donde metilaciones específicas sobre Sam68 conllevan la exportación del ARN [140]. En el caso de las acetilaciones en residuos de lisina, en el interior del dominio CSG, provoca una regulación positiva en dicha interacción con ARN [142,167].

### - Sam68 en la regulación transcripcional

No existen datos claros acerca de la implicación de Sam68 en la regulación transcripcional de la expresión de genes: sabemos que la unión de Sam68 a hnRNP K inhibe la función de la misma en la activación transcripcional de un reportero dirigido por el elemento promotor CT del proto-oncogén c-myc [168]. También se ha visto que Sam68 reprime varias construcciones de promotores virales y de mamíferos y se ha visto que esta función es independiente de la capacidad de Sam68 de unir ARN [169]. En estos escenarios, se piensa que Sam68 se comporta como un inhibidor competitivo de reguladores positivos de la transcripción.

Es probable que el papel de Sam68 como co-regulador transcripcional sea dependiente del promotor y del factor de transcripción con el que interaccione. Hay estudios que demuestran cómo Sam68 induce un incremento en la actividad transcripcional del receptor de andrógenos de manera independiente a la capacidad de unión a ARN [170].

### - Sam68 en el corte/empalme alternativo

Tanto Sam68 como algunas proteínas de su misma familia (SML1 o T-STAR), pueden formar parte de la ruta de transducción de la señal para la selección del corte/empalme alternativo [171]. Se ha demostrado la asociación de proteínas STAR con el complejo del espliceosoma [172,173]; y a su vez se ha relacionado con otros factores de splicing como hnRNP A1 y D, Tra2, SF2/ASF, 9G8, SRp30c, SRp86 [172-176] entre otras más.

Otro ejemplo del posible papel de Sam68 en el corte/empalme alternativo se ve en la desregulación de los variantes del transcrito del gen de CD44, implicado en cáncer. La inducción de la inclusión del exón variable v5 de CD44 tiene lugar de forma dependiente de fosforilación de Sam68 por ERK, en respuesta a la activación de Ras por estímulo con ésteres de forbol en células de linfoma T de ratón [177]. Después se observó que Sam68 coopera con el activador de splicing SRm160 en la regulación del splicing alternativo de CD44 [178]. Además también existen estudios que muestran cómo Sam68 participa en el splicing

alternativo de genes que están implicados en enfermedades neurogénicas como la atrofia muscular espinal [179] o el síndrome de X Frágil con temblor/ataxian [180].

Para terminar se encuentran estudios que relacionan el papel en el corte-empalme alternativo en adipogénesis, observando resultados que demuestran esencial la participación de Sam68 en la correcta regulación postranscripcional del gen mTor en este proceso [181] y cómo se altera la adipogénesis a través de esta vía.

### **Sam68 y desarrollo**

Sam68 participa y juega un papel importante en el desarrollo de muchas especies conocidas. Se han realizado varios estudios donde generan un ratón *knockout* de Sam68 y donde se observa una disminución de la viabilidad del individuo, sin llegar a ser letal [182,183] aunque con razones no conocidas del todo en la actualidad. Con respecto a la reproducción, se conoce cómo los machos Sam68<sup>-/-</sup> (ratón) resultan estériles además de encontrar unos niveles de estrógenos en las hembras muy disminuida.

También se cree que Sam68 pueda tener una función importante en el desarrollo de la embriogénesis, ya que se conoce que es uno de los primeros genes transcritos durante la activación del genoma zigótico en la etapa de dos células; se demostró además que en las primeras divisiones del embrión es necesaria la actividad de quinasas de la familia de Src y Fyn [184,185], poniendo de manifiesto que Sam68 podría participar modulando la preimplantación del embrión de ratón.

### **Sam68 y la diferenciación celular**

Conectando con el apartado anterior existen estudios que muestran cómo en ratones KO para Sam68 la diferenciación hacia espermatozoides maduros de las células germinales resulta defectuosa, dando un fenotipo oligospermico con una gran afectación al tamaño de los testículos, llegando a la conclusión que el papel de esta proteína STAR resulte imprescindible para la correcta diferenciación hacia espermatozoides

maduros. Además estos ratones *knockout* para Sam68 presentan unas deficiencias en el desarrollo normal de las divisiones meióticas y la diferenciación de la célula haploide, explicándose como un efecto de la traducción reducida de varios de los ARNm diana de Sam68 durante la meiosis [186].

Con respecto al metabolismo óseo es conocido cómo los ratones *knockout* de Sam68 muestran en su mayoría defectos en la diferenciación celular del mesénquima, un metabolismo óseo con mayor diferenciación osteoblástica y menos diferenciación adipocitaria [183].

La ruta central por la que la leptina regula la resorción ósea implica al sistema nervioso simpático sobre los osteoblastos por vía  $\beta$ -adrenérgica, [187,188]. La disminución de los niveles de leptina que ocurre en ratones Sam68<sup>-/-</sup> es consistente con el hecho de que estos ratones presentan mayor masa ósea que los controles. Estos datos sugieren que la ruta simpática de la leptina no se altera en estos ratones. Así, Sam68 puede regular el metabolismo óseo de dos formas: [142] la reducción de los niveles de leptina reduce la resorción ósea y [189] la ausencia de Sam68 favorece la diferenciación osteoblástica de forma preferencial a la diferenciación adipocítica [183].

Como hemos comentado anteriormente existe un estudio en la línea celular 3T3-L1 [190] donde se prueba cómo Sam68 participa en el splicing alternativo de mTor [191], una proteína que actúa como un regulador del tamaño y proliferación celular en respuesta a nutrientes y varios factores de crecimiento. Aquí se observa cómo una inhibición de Sam68 provoca una importante incapacidad de diferenciación celular, mostrando una pobre acumulación lipídica al final del proceso.

Por último se conoce que participa también en la diferenciación neuronal, un proceso durante el cual muchos de los ARNm diana de Sam68 sufren splicing, incluyéndose genes importantes en la neurogénesis desde el punto de vista de la organización del citoesqueleto (Numa1, Clasp2, and Sgce), la biogénesis organular y el transporte (Bin1, Ktn1, Kifap3 y Opal) y la sinaptogénesis (Cadm1, Dlgh4, y Sorbs1) [192]. En ratones KO de Sam68 se observó también un déficit en la coordinación motora y neurogénesis que aún no está completamente clarificada [182].

## Sam68 y cáncer

La relación de Sam68 con respecto al cáncer está todavía en entredicho, ya que existen estudios para apoyar tanto un papel pronocogénico como lo contrario. Los primeros indicios apuntaban a que pudiera ejercer una función de supresión de tumores, sin embargo pronto aparecieron numerosos estudios que indicaban una función pronocogénica [193]. Al parecer Sam68 podría actuar sobre la supervivencia y el crecimiento celular dependiendo en más medida de factores como su localización y modificación post-traducciona (fosforilación, metilación, acetilación o sumoilación) que de los niveles de expresión génica.

Con esto vamos a comparar los diferentes estudios que apoyan una u otra causa:

### - Supresión de tumores

En primer lugar se vio cómo en células NIH3T3 Sam68 está implicado en la proliferación y tumorigénesis, mostrando un crecimiento independiente de anclaje y tumores con metástasis [194]. Por esto se sugirió que Sam68 podría tener propiedades de supresión de tumores e inhibición del crecimiento. Sin embargo, el mecanismo por el que Sam68 modula la tumorigénesis, es desconocido.

La sobreexpresión de Sam68 induce la detención de crecimiento en G1 regulando de forma negativa la expresión de ciclinas D1 y E de manera independiente a su capacidad de unión a ARN [141,150]. Así parece que Sam68 podría participar como controlador negativo del ciclo celular. Con el mismo resultado se encuentran los estudios que analizaban la sumoilación de Sam68 en residuos de lisina. Se observó cómo la capacidad de inhibición en la expresión génica de la ciclina D1 es incluso mayor que en el caso anterior [143], oponiéndose al avance del ciclo celular.

Sin embargo, otros estudios sobre el efecto de la haploinsuficiencia de Sam68 en ratones Sam68<sup>-/-</sup> han demostrado que estos alcanzan la edad anciana y no desarrollan tumores, sugiriendo que Sam68 no sería un supresor tumoral in vivo [195].

### - Apoptosis

Se ha demostrado que Sam68 promueve apoptosis, efecto que requiere su capacidad de unión a ARN, ya que la sobreexpresión del mutante de Sam68 que carece del dominio KH no induce muerte celular [196]. Sam68 tirosín fosforilado por las quinasas Src y las quinasas nucleares BRK/Sik, presenta reducida su capacidad de unión a ARN in vitro. Así, también se ha encontrado que la coexpresión de las formas activas de Src o BRK suprime la apoptosis en células que sobreexpresan Sam68 [150], lo que sugiere que la fosforilación de Sam68 por estas quinasas u otras quinasas pueden disminuir su capacidad de inducir apoptosis. La fosforilación en serina/treonina puede también estar implicada en la regulación de la función pro-apoptótica de Sam68. Son por tanto, las funciones relacionadas con la capacidad de unión a ARN, las que aportan a Sam68 un papel relacionado con la apoptosis.

El splicing alternativo también resulta importante en el control de la apoptosis. Varios factores de muerte celular sufren corte/empalme alternativo, dando lugar a isoformas con funciones opuestas durante la muerte celular programada [197]. Un ejemplo claro es el transcrito de Bcl-x, que por splicing alternativo, produce la forma antiapoptótica Bcl-x (L) o la proapoptótica Bcl-x (s) [198]. La elección de splicing alternativo del pre-ARNm de Bcl-x (s) refleja la sensibilidad de la célula hacia agentes que inducen la apoptosis, siendo Bcl-x (L) regulado positivamente en células de cáncer [199,200].

Se ha visto mediante inmunoprecipitación y posterior retrotranscripción y amplificación por PCR, que Sam68 se une específicamente a los ARNs endógenos de factores apoptóticos como Bak, Bax, Bcl-x y Bim, pero no Bcl2 [201-203]. Al tiempo que hace disminuir los niveles de expresión génica de factores de crecimiento como EGF o EGF-1 [204].

### - Papel prooncogénico

Su silenciamiento en células de cáncer prostático retrasa la progresión del ciclo celular y reduce la proliferación, causando una acumulación de ciclina D1 [204]. En estas mismas células la producción

de ciclina D1 está potenciada hacia la isoforma “D1b” con un potencial oncogénico mucho mayor [205]. La inhibición de Sam68 ha conllevado a una regulación a la baja de algunos genes “protectores de apoptosis” como BCL2L1, clusterina o reparadores del ADN como por ejemplo el gen BRCA1.

Con respecto a la tumorigénesis y progresión tumoral destacamos los siguientes estudios que confirman ese posible papel prooncogénico de Sam68:

- Sam68 es sustrato de la quinasa de cáncer de mama, BRK [112], que se encuentra sobreexpresada en aproximadamente el 60% de los tumores de mama [206].
- Sam68 es un sustrato del factor de crecimiento epitelial EGF. Esto, junto con el ya comentado efecto antiapoptótico, sugiere que es necesaria la fosforilación en tirosina de Sam68 para la tumorigénesis [131].
- La expresión de Sam68 y su localización citoplásmica, se ha considerado marcador pronóstico en cáncer de células renales [207].
- La expresión de Sam68 media el efecto proliferativo del receptor de insulina y leptina en células de cáncer de mama [208].

### **Metabolismo vírico**

Se ha visto que Sam68 podría intervenir tanto en el transporte retroviral como en la replicación de virus. Existe una proteína llamada Rev que participa activamente en la exportación nuclear del ARN no procesado o de forma incompleta [209]. Esta proteína es una proteína de transporte con un dominio básico de unión a ARN que interacciona con el virus a través de una secuencia llamada RRE (elemento de respuesta a Rev); Se ha demostrado que Sam68 se une también a esta secuencia RRE in vitro e in vivo, y facilita la exportación de los ARNs retrovirales no procesados que contienen RRE de HIV [135].

Además con el *knockdown* de Sam68 se inhibe el transporte del ARN mediado por Rev, siendo también dependiente de un estado no fosforilado y de la señal de localización nuclear de Sam68 [210].

Sam68 interacciona específicamente con la ARN polimerasa dependiente del ARN del virus 3D de la polio [211].

Otras funciones encontradas sobre el metabolismo vírico de Sam68 son la poliadenilación [212] o la regulación traduccional de su ARN [213].

Estos estudios sobre las posibles funciones de Sam68 sobre diferentes virus están todavía en sus inicios. Existen todavía muchas dudas sobre los mecanismos moleculares capaces de gobernar estos procesos, por lo que el papel exacto que ejerce Sam68 está todavía por sacar a la luz.

# OBJETIVOS



## //. OBJETIVOS

Como hemos descrito anteriormente Sam68, es una proteína STAR (transductor de señales y activador del metabolismo de ARN) implicada en la transducción de señales y la activación del metabolismo del ARN a través de su dominio de homología KH.

Nuestro grupo ha participado en el estudio del papel de Sam68 en diferentes procesos bioquímicos, sobre todo en respuesta a insulina y leptina. La insulina es uno de los mediadores importantes de la diferenciación del adipocitos. Por ello, sam68 podría ser un elemento importante en dicho proceso. Además dicha función podría ser aprovechada para desplazar el fenotipo de expresión característico de los adipocitos maduros a otro fenotipo en el que sólo determinados genes vean favorecida su expresión, los genes de proteínas que podrían ser beneficiosos para luchar desde dentro contra la expansión del tejido adiposo.

Nos planteamos, por tanto, los siguientes objetivos:

**1. Estudiar cómo se modifica la expresión de Sam68 en el proceso de diferenciación de los adipocitos, evaluando el nivel de expresión de Sam68, y su nivel de fosforilación a lo largo de la diferenciación de las células 3T3-L1 en adipocitos.**

**2. Estudiar la importancia de la expresión de Sam68 en el proceso de diferenciación de los adipocitos por dos abordajes:**

a) Investigar el efecto de la sobreexpresión de Sam68 en el proceso de la diferenciación de los adipocitos.

b) Estudiar el efecto permisivo de Sam68 sobre la diferenciación de los adipocitos inhibiendo su expresión.



# MATERIAL Y MÉTODOLOGÍA



### **III. MATERIAL Y MÉTODOLÓGÍA**

Para responder a los objetivos planteados utilizamos los materiales y métodos que se describen en esta sección. La parte experimental de esta Tesis se apoya en protocolos ya utilizados y contrastados por otros grupos de investigación. En muchos de los experimentos hemos realizado modificaciones o mejoras, para optimizar los resultados obtenidos del trabajo con nuestra línea celular.

#### **1. CULTIVOS CELULARES**

##### **1.1. LÍNEA CELULAR: 3T3-L1**

La línea celular utilizada para realizar este trabajo fue la línea celular 3T3-L1 las células fueron amablemente cedidas por el Prof. Juan Carlos Prieto del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Alcalá de Henares. Se trata de células de tipo fibroblasto obtenidas a partir de embrión de ratón. Originalmente, estas células provienen de la línea celular 3T3 (Swiss albino) sometidas a un proceso de aislamiento clonal desarrollado por Green y colaboradores (Green y Meuth, 1974), eligiendo aquellos clones capaces de diferenciarse de fibroblastos a adipocitos en presencia de un cóctel hormonal.

##### **1.2. MEDIOS DE CULTIVO**

###### **- Medio de crecimiento**

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento de la línea celular 3T3-L1 es DMEM suplementado con:

- Suero fetal bovino (SFB) al 10%, previamente descomplementado.
- Antibiótico (L-penicilina 100  $\mu$ U/mL + Estreptomicina 100  $\mu$ g/mL).
- L-Glutamina (2mM)

Durante determinados protocolos experimentales se requirió modificación de la anterior composición según los casos, sin la adición de antibiótico o sin SFB.

- Medio de diferenciación.

Las células fueron cultivadas con medio de crecimiento hasta alcanzar una confluencia del 100% y se mantuvieron así durante dos días. Ahora se induce la diferenciación (día 0) incubando las células durante 48 horas en presencia de medio de cultivo de crecimiento añadiendo lo siguiente:

- IBMX (500  $\mu$ M)
- DXM (250 nM)
- Insulina (500 nM).

A partir del tercer día de cultivo, el medio de crecimiento fue suplementado únicamente con insulina (500 nM) hasta la completa diferenciación celular.

## **2. WESTERN BLOTTING**

### **2.1. TAMPONES**

- PBS

Solución utilizada para el lavado de los cultivos. La composición de este tampón de *Dulbecco*, sin  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$ , es:

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1440 mg/l; cloruro sódico 90000 mg/l;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  7950 mg/l.

- Tampón de lisis celular (o tampón de extracción)

Se utiliza para el lisado celular de los cultivos y la solubilización de proteínas asociadas a membranas. Se prepara una solución stock 5x (pH 8):

- Tris base 100 mM; Tris ácido 100 mM; Cloruro sódico 685 mM; Cloruro cálcico 5 mM; Cloruro magnésico 5 mM.

En el momento de uso, el stock se diluye a concentración final 1x agregando:

- Glicerol 10% v/v; Nonidet P-40 1% v/v; inhibidores de proteasas (*Complete Mini de Roche®*)

Una vez añadidos los inhibidores de proteasas (según protocolo del producto) el tampón de lisis celular, se ajusta el pH a 8 y debe conservarse a 4 °C.

- Tampón de carga de proteínas para electroforesis SDS-PAGE (o Tampón de Laemli)

En este tipo de electroforesis se necesita un tampón con agentes desnaturalizantes para las proteínas que van a ser separadas tras cargarse negativamente; un agente reductor de puentes disulfuro, que se añade en el momento de utilización, y un marcador colorante del frente de electroforesis.

- Tris ácido 1 M al 25% v/v; glicerol al 50% v/v; SDS 10% p/v; DTT 100 mM; azul de bromofenol 0,001% p/v; pH 6,8.

- Tampón para la electroforesis en gel de poliacrilamida (“running buffer”)

Permite el desplazamiento anódico de las proteínas desnaturalizadas y cargadas negativamente:

- Tris-Glicina al 10% v/v (Tris Base 250 mM; Glicina 1,92 M); SDS en stock del 20% al 0,5% v/v final.

- Tampón para la transferencia de las proteínas del gel de poliacrilamida

Se utiliza para facilitar la transferencia tras empapar el papel Whatman y la membrana de nitrocelulosa que usaremos:

- Tris-Glicina al 10% v/v (Tris Base 250 mM; Glicina 1,92 M); Metanol 100% al 20% v/v final; SDS 20% al 0,2% v/v final.

- Solución de bloqueo

Se utiliza para bloqueo de la membrana una vez que se ha realizado la transferencia. Evita en parte interacciones inespecíficas del anticuerpo primario y secundario. También la solución de bloqueo es el medio donde se realiza la dilución de anticuerpos primarios.

· PBS con *Tween* al 0,2% albúmina al 3% p/v y azida al 1M 0,3% v/v.

- Solución de lavado PBS-T

Es el tampón en el que se realizan las incubaciones con el anticuerpo así como los lavados de la membrana tras la transferencia de proteínas del gel de poliacrilamida, en la técnica de western-blot. Consiste en PBS con la adición de detergente *Tween* al 0,2%.

## 2.2. GELES

Se utilizaron geles preparados manualmente, que constan de:

- Gel de separación:

- 7, 10 o 15% v/v de acrilamida/bis-acrilamida.
- Tampón separación: Tris 0,75 M pH: 8,8 y SDS 0,2%; al 50% v/v.
- Persulfato amónico (APS) al 10% p/v; al 0,375% v/v.
- TEMED al 0,375% v/v.

- Gel de concentración:

- 1% v/v de acrilamida/bis-acrilamida.
- Tampón de concentración: Tris 0,25 M pH: 6,8 y SDS 0,2% al 50% v/v.
- Persulfato amónico (APS) al 10% p/v; al 0,25% v/v.
- TEMED al 0,25% v/v.

### 2.3. ANTICUERPOS

#### - Anticuerpos primarios

Estos anticuerpos han sido empleados en los diferentes experimentos para la detección de proteínas por este sistema:

1. Anti-Sam68 C-terminal C20. (*Santa Cruz Biotechnology*®). Es un anticuerpo IgG policlonal de conejo.
2. Anti-Tubulina (*Santa Cruz Biotechnology*®). Anticuerpo monoclonal de ratón.
3. Anti-PPAR- $\gamma$  H-100 (*Santa Cruz Biotechnology*®). Es un anticuerpo IgG policlonal de conejo.
4. Anti-C/EBP $\alpha$  14AA (*Santa Cruz Biotechnology*®). Es un anticuerpo IgG policlonal de conejo.
5. Anti-C/EBP $\beta$  C-19 (*Santa Cruz Biotechnology*®). Es un anticuerpo IgG policlonal de conejo.
6. Anti-C/EBP $\delta$  M-17 (*Santa Cruz Biotechnology*®). Es un anticuerpo IgG policlonal de conejo.
2. Anti-Phosphotyrosine 4G10 (*Millipore*). Es un anticuerpo IgG monoclonal de ratón.

#### - Anticuerpos secundarios:

- A. Anti-IgG de conejo, obtenido de burro (*Amersham Pharmacia Biotech*®).
- B. Anti-IgG de ratón, obtenido de oveja (*Amersham Pharmacia Biotech*®).

### 3. INMUNOPRECIPITACIÓN

- Tampón de lisis celular (o tampón de extracción)

Se utiliza para el lisado celular de los cultivos y la solubilización de proteínas asociadas a membranas. Se prepara una solución stock 5x (pH 8):

- Tris base 100 mM; Tris ácido 100 mM; Cloruro sódico 685 mM; Cloruro cálcico 5 mM; Cloruro magnésico 5 mM.

En el momento de uso, el stock se diluye a concentración final 1x agregando:

- Glicerol 10% v/v; Nonidet P-40 1% v/v; inhibidores de proteasas (*Complete Mini de Roche*®)

Una vez añadidos los inhibidores de proteasas y fosfatasas (según protocolo del producto) el tampón de lisis celular, se ajusta el pH a 8 y debe conservarse a 4 °C.

- Proteína G-Sefarosa (*GE Healthcare*)

#### 3.1. ANTICUERPOS (Inmunoprecipitación)

1. Anti-Sam68 C-20 (*Santa Cruz Biotechnology*®). Es un anticuerpo IgG de conejo.

## 4. Q-PCR

Para el análisis cuantitativo de la expresión de Sam68 y el resto de genes descritos en este estudio, se utilizó la técnica de PCR a tiempo real empleándose un termociclador *Miniopticon* de *BioRad* y el reactivo fluorescente SYBR green, capaz de emitir fluorescencia cuando se intercala en el ADN de doble cadena. Las reacciones de PCR se realizaron por duplicado en un volumen final de 25 µl conteniendo entre 100-250 ng de ADNc como molde, 10 nM de cada oligonucleótido cebador y 12,5 µl de *Sensifast SYBR No-ROX kit* (*Bio-Rad*). Se utilizaron las parejas de oligonucleótidos para los diferentes genes, detalladas en la siguiente tabla:

-Primers para PCR:

Sam68 Sentido:	5'-TTTGTGGGGAAGATTCTTGG-3'
Sam68 Antisentido:	5'-GGGGGTCCAAAGACTTCAAT-3'
Ciclofilina Sentido:	5'-TCCCTGGAGAAGAGCTACGA-3'
Ciclofilina Antisentido:	5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'
C/EBP $\alpha$ Sentido:	5-CCG GCC GCC TTC AAC GAC-3
C/EBP $\alpha$ Antisentido:	5-CTC CTC GCG GGG CTC TTG TTT-3
C/EBP $\beta$ Sentido:	5- GCGGGGTTGTTGATGTTT-3
C/EBP $\beta$ Antisentido:	5- CTTTAATGCTCGAAACGG-3
C/EBP $\delta$ Sentido:	5- ACGACGAGAGCGCCATC-3
C/EBP $\delta$ Antisentido:	5- TCGCCGTCGCCCCAGTC-3
PPAR $\gamma$ Sentido:	5- CCAGAGTCTGCTGATCTGCG-3
PPAR $\gamma$ Antisentido:	5- GCCACCTCTTTGCTCTGATC

## 5. TINCIÓN POR OIL RED

### -STOCK DE OIL RED:

- 0,35 g /0,7 g Oil Red.
- 100 ml /200 ml isopropanol.
- Agitar o/n filtrar (0.2  $\mu$ m) y almacenar a +4 °C.

### -SOLUCIÓN DE TRABAJO DE OIL RED:

- 6 partes del stock de Oil Red.
- 4 partes de agua destilada.

## 6. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPAMIENTO

### 6.1. REACTIVOS

#### - Cultivos:

- Medio DMEM (*BioWhittaker™, Lonza*). Medio modificado de *Dulbecco*.
- Suero fetal bovino para suplementar el medio de cultivo. (*BioWhittaker™ FBS, Lonza*)
- Antibióticos (10000 U/mL de penicilina, 10000 mg/mL estreptomina) para completar el medio de cultivo (*Invitrogen, GIBCO*)
- L-Glutamina, 100 ml, 200mM (*Lonza*)
- Tripsina 10x 2,5% (p/v): produce la digestión de las proteínas de adherencia (*Invitrogen, GIBCO*)

#### -Western blotting e inmunoprecipitación:

- Marcador de peso molecular de proteínas: “Sigma Marker Wide Range MW 6,500- 250,00” (*Sigma Aldrich*)
- Kit para la medición de la cantidad de proteína: “BCA™ protein assay reagent kit” (*Thermo Scientific Ink.*).

- Sistema de detección luminol/peroxidasa. Sistema quimioluminiscente “Super Signal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate” (*Thermo Scientific Pierce*).
- Líquido revelador/fijador *Ilford®* y películas de autorradiografía “Hyperfilm ECL” (*Amersham*)
- Proteína G-Sepharose™ (*GE Healthcare*)

-Transfección:

- Reactivo “Lipofectamine2000®” (*Invitrogen*).
- Para la inhibición de Sam68 se usó: “Trifecta kit” (*IDT*).

- q-PCR:

- Reactivo TRIsure® para la extracción y aislamiento del ARN total de las células en cultivo (*Bioline*)
- “Quantitect Reverse Transcription Kit” (*Quiagen*)
- “Sensifast SYBR No- ROX kit” (*Bioline*)

## 6.2 MATERIALES

- Pipetas Pasteur *Copan innovation, LTD*.
- Pipetas estériles de plástico de 5 y de 10 ml (*Greiner bio-one®, Cellstar®*)
- Jeringas estériles en bolsitas individuales de 5, 10 y 20 ml: “*BD Discardit™ IP*”, B-DIS y filtros esterilizantes 0,2 µm “*Plastimed*”.
- Tubos de polipropileno de 15 ml estériles y de 50 ml (*BD FALCON™* y *Greiner bio-one® Cellstar®*).
- Tubos estériles *DeltaLab S.A*, de 15 mL.
- Frascos estériles de 100 mL *Soria genlab. SA*.
- Tubos *Eppendorf®* de 1,5-2 mL.
- Filtros Prodimer *Plastimed®* de 0,2 mM.
- Placas Petri estériles 10 ml, *Sarstedt*.
- Placas de 6 pocillos *Nunclon™ Delta Surface*.
- Frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> *Sarstedt*.
- Parafilm “M”, Laboratory Film (*American National Can™, Chicago IL*).

- Geles Tris-Glicina de poliacrilamida en gradiente de 8-16%, *Novex Invitrogene*.
- Papel *Whatman*®
- Puntas de plástico para pipetas: blancas, amarillas pequeñas, azules: *Greiner bio-one, Difco*.
- Jeringas *BD Plastipak*® 1 ml.
- Membrana de nitrocelulosa para la transferencia de proteínas (*Amersham ibérica*).
- Cubeta de electroforesis *Mini Protean Tetra Cell*®, de *BioRad Inc.*
- Cristales y Sistema de geles *BioRad Inc.*
- Cassette para revelado *Gevamatic AGFA*® *Gevaert*.
- Recipientes de cristal para las incubaciones de las membranas con los anticuerpos en los WB.
- Probetas, vasos de precipitados, matraces y demás utensilios normalmente empleados para hacer las disoluciones.

### 5.3 EQUIPAMIENTO

- Campana de flujo laminar vertical *TETSTAR AV-100 S.A*
- Baño de incubación: tipo 31AT, 1200 W (*Heto-Holten A/S*)
- Incubador de CO<sub>2</sub> para cultivos celulares (*REVCO*®)
- Balanza *COBOS*® *Precisión M-200*
- Fuente de alimentación para electroforesis y transferencia modelo *Amersham Pharmacia Biotech*® *EPS 301*
- Microcentrífuga refrigerada modelo *Biofuge Fresco*®, aceleración máxima de 16000 x g (*Heraeus Instruments*)
- Microscopio de luz invertida *WILD M-40 HEERBRUGG*.
- Medidor de pH de *Crison Instruments SA*, modelo *Micro pH 2002*.
- Termobloque incubador de microtubos (*Stuart Scientific*®).
- Sistema de esterilización por autoclavado (*Raypa SL*).
- Sistema de transferencia de proteínas semi-seco (*Invitrogen*).
- Espectrofotómetro *Ultrospec IIE, LKB Biochrom* (*Amersham Pharmacia*).
- Espectrofotómetro para medición de ácidos nucleicos *WPA Biowave, Biochrom Ltd.*
- Pipetas automáticas *Biopipette*® (0.5-10 mL, 2-20 mL, 10-200 mL y 100-1000 mL)

- Incubador rotor (*Selecta*).
- Estufa con agitación *Infors HT- Ecotron*.
- Sistema de balanceo (*GFL™ 3600*).
- Vortex *Heidolph Reax® 2000*.
- Cobas Integra 6000 (*Roche™*)
- -Termociclador RT-PCR: *Biometra, T-Gradient*
- Termociclador Real Time: *Mini Opticon™, Personal Thermal Cyclers (Biorad)*

## 7. METODOLOGÍA

### 7.1 CRECIMIENTO Y DIFERENCIACIÓN CELULAR

La línea celular utilizada para realizar este trabajo fue la línea celular 3T3-L1. Se trata de células de tipo fibroblasto obtenidas a partir de embrión de ratón. El cultivo de esta línea celular se realizó siguiendo las pautas indicadas por la ATCC (American Type Culture Collection), teniendo siempre en cuenta que las células no alcancen un grado de confluencia superior al 70-80%, ya que, de lo contrario, se reduciría su capacidad de diferenciación a adipocitos. Todos los cultivos celulares se han llevado a cabo en un incubador a 37 °C con 95% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>. Por último, es importante destacar que todos los experimentos sobre células 3T3-L1 incluidos en este trabajo se han llevado a cabo con células entre los pases 4-15; A partir del cual los cultivos fueron desechados y sustituidos por un nuevo vial de células.

Las células 3T3-L1 fueron cultivadas en medio de crecimiento usando frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> para los pases de mantenimiento; aplicando una solución comercial que contiene tripsina 0,5 g/l y EDTA 0,2 g/l, para separar las células en cada pase.

Las células utilizadas para microscopia se sembraron sobre cubreobjetos de vidrio de 25 mm que fueron colocados en placas de 6 pocillos. Las células destinadas a la obtención de extractos de ARN o lisados de proteínas también se cultivaron en placas de 6 pocillos.

El proceso de diferenciación a adipocitos se basó en el siguiente protocolo:

Las células fueron cultivadas con medio de crecimiento hasta alcanzar una confluencia del 100%. Dos días después se induce la diferenciación (día 0) incubando las células durante 48 horas en presencia de medio de cultivo conteniendo IBMX [214], que incrementa los niveles de AMPc por inhibición de la fosfodiesterasa, DXM (250 nM) que activan el factor de transcripción C/EBP- $\beta$  e insulina (500nM). A partir del tercer día de diferenciación, el medio de crecimiento fue suplementado únicamente con insulina (500 nM) hasta la completa diferenciación celular, que se puede alcanzar a partir del séptimo-octavo día aproximadamente.

Las células fueron aisladas para su posterior análisis por qPCR o WB en los días: -2 (preadipocitos), 0, +2, +4, +6, +8 según la inducción a la diferenciación celular (día 0).

## 7.2 TRANSFECCIÓN

Seguimos el protocolo del fabricante:

1. Se cultivaron las células 3T3-L1 en placas de 6 pocillos con 2 mL de medio de crecimiento. 24 horas antes de la transfección es necesario cambiar el medio de cultivo preferiblemente utilizando medio sin suero y sin antibióticos.
2. Se preparan las diluciones del plásmido (o SiRNA) a transfectar [215] de tal forma que la cantidad final de ADN utilizado sea de 4  $\mu\text{g}$ /pocillo (cantidad optimizada) y lo diluimos en medio de crecimiento sin suero fetal bovino y sin antibióticos para un volumen final de 250  $\mu\text{l}$  por pocillo.
3. La cantidad de reactivo de *Lipofectamnie2000*® fue de 10  $\mu\text{l}$  por pocillo. Se prepara la dilución utilizando el mismo medio que en el caso anterior y usando el mismo volumen. Se añade el reactivo sobre el medio y se incuba a temperatura ambiente durante 5 min.

4. Se mezclan las diluciones del plásmido (o SiRNA) y del reactivo y se agita suavemente. Se incuba a temperatura ambiente durante, al menos, 20 min.
5. Se añade la mezcla final gota a gota sobre el cultivo de células 24 horas antes de la inducción de la diferenciación (día -1).
6. Después de 6-8 horas se puede sustituir el medio de transfección por medio de crecimiento normal.

### 7.3 Q-PCR

#### - Aislamiento de ARNm.

El aislamiento del ARNm total de las muestras procedentes de la línea celular 3T3-L1 se llevó a cabo utilizando el reactivo *Trisure* (*Bioline*), siguiendo las recomendaciones del fabricante: Se añadió 1 ml de dicho reactivo a cada muestra. El procedimiento seguido se detalla a continuación:

1. Las células se lisaron añadiendo 1 ml de reactivo por pocillo (placa de 6 pocillos)
2. Se pipeteó varias veces para una completa lisis celular y se recogió la muestra en un tubo.
3. Incubación de 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Se añadió a la muestra 0,2 ml de cloroformo por cada ml de *Trisure* añadido inicialmente.
5. Se mezcló la muestra y el cloroformo durante 5-10 s y se incubó a temperatura ambiente durante 2-3 min.
6. Centrifugación a 12000 x g durante 15 min a 4 °C. Tras la centrifugación, se observan 3 fases distintas: la fase inferior o fase orgánica que contiene las proteínas, la fase intermedia donde se localiza el ADN y la fase superior o fase acuosa que contiene el ARN.

7. Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo.
8. Anadir 500  $\mu$ l de isopropanol a cada muestra por cada ml de *Trisure* utilizado inicialmente. En este paso el ARN precipita. Incubar la mezcla durante 10 min a temperatura ambiente.
9. Centrifugar 10 min en las mismas condiciones que las descritas en el apartado 6 y retirar el sobrenadante.
10. Lavar el pellet con 1 ml de etanol al 75%.
11. Centrifugar a 7500 x g durante 5 min a 4 °C.
12. Retirar el etanol y dejar secar el ARN a temperatura ambiente.
13. Resuspender el ARN en H<sub>2</sub>O libre de ARNasas en un volumen apropiado en función del pellet obtenido.
15. Cuantificar la cantidad y calidad del ARN total obtenido en el espectrofotómetro haciendo una dilución 1:100.

En todos los casos, la concentración de ARN total obtenido se determinó por espectrofotometría y su calidad se comprobó mediante la relación entre la absorbancia a 260 y 280 nm.

#### - Retrotranscripción del ARN

La retrotranscripción de ARN se realizó utilizando el kit comercial *Quantitect Reverse Transcription Kit (Quiagen)* sobre una cantidad de ARN total de partida de 1  $\mu$ g. La retrotranscripción se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del proveedor comercial:

1. Se descongelaron las muestras en hielo y se prepararon las siguientes cantidades por reacción: 2  $\mu$ l del buffer para la eliminación del ADN genómico, más 12  $\mu$ l de una dilución con 1  $\mu$ g de ARN total de la muestra.
2. Se incubaron 2 min a 42°C.

3. Se añadieron los siguientes reactivos por reacción: 1  $\mu$ l de tubo con la retrotranscriptasa inversa, 1  $\mu$ l de mix de primers y 4  $\mu$ l de buffer de reacción; para un volumen final de 20 $\mu$ l.
4. Incubar 15 min a 42°C.
5. Incubar 3 min a 95°C, para la desactivación de la retrotranscriptasa inversa.
6. Se guarda el ADN complementario [145] a -20°C.

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

Las reacciones de PCR se realizaron por duplicado en un volumen final de 25  $\mu$ l conteniendo 50-100 ng de ADNc como molde, 240 nM de cada oligonucleótido cebador y 12,5  $\mu$ l de *Sensifast SYBR No ROX kit*, (*Bioline*). Se utilizaron las parejas de oligonucleótidos para Sam68, C/EBP  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y PPAR $\gamma$  (detalladas en la “tabla de primers”) y los cebadores para amplificar Ciclofilina como gen de referencia.

La amplificación de los diferentes genes se llevó a cabo siguiendo un programa que consistió en un primer paso de desnaturalización a 94 °C durante 2 min seguido por 40 ciclos de amplificación formados por un paso de desnaturalización a 94 °C durante 5 s , alineamiento a 58 °C durante 10 s y extensión a 72 °C durante 5 s. Tras los ciclos de amplificación, se realizó una “curva de desnaturalización” para asegurar la especificidad de los productos amplificados.

El cálculo de la expresión génica se realizó usando los valores de “ciclo umbral” (Ct) proporcionados por el termociclador. Los  $\Delta$ Ct se determinó restando el valor de Ct de la amplificación de la Ciclofilina (control interno) al valor de Ct específico de cada gen de interés. Finalmente, el valor  $\Delta\Delta$ Ct se calculó restando el  $\Delta$ Ct de cada muestra problema al valor de la muestra utilizada como control (100%).

## 7.4 WESTERN BLOT

Mediante el western blotting [216] también llamado *immunoblotting* o inmunotransferencia, se utiliza un anticuerpo para detectar de forma específica su antígeno proteico, permitiendo que una proteína sea identificada entre una mezcla compleja de éstas y obteniendo datos cualitativos y semicuantitativos de ella.

### - Obtención de extractos proteicos.

Durante el presente estudio se llevaron a cabo análisis de proteínas mediante western blot. Los extractos proteicos se obtuvieron de cultivos celulares utilizando el tampón de lisis celular, descrito anteriormente, suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa.

Los cultivos celulares, antes de la extracción de proteínas, se lavaron dos veces con PBS 0,01 M, pH 7,4, para eliminar restos de medio de cultivo. Las células se lisaron en un volumen adecuado de tampón de extracción. A continuación, los extractos de células se homogenizaron con ayuda de una pipeta. Posteriormente, se centrifugaron las muestras durante 10 min a 9000 x g a 4 °C para eliminar proteínas insolubles y restos celulares y los sobrenadantes se conservaron a -80°C hasta su uso, después de normalizar la cantidad de proteínas de todas las condiciones mediante el método del BCA, según fabricante (*Thermo Scientific*).

### - Electroforesis desnaturizante y electrotransferencia.

Para la detección de las proteínas de interés mediante la técnica de western blot, el siguiente paso fue preparar las muestras para su separación electroforética. Para ello, se utilizaron entre 25-50 µg de proteína y se mezclaron con el tampón de carga de proteínas (descrito anteriormente). A continuación, las muestras se calentaron durante 5 min a 95 °C para desnaturizar las proteínas y, finalmente, se centrifugaron a 8000 x g durante 5 min a 4 °C para eliminar restos insolubles. Una vez preparado el extracto proteico, este se sometió a electroforesis desnaturizante en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, 10-15% de poliacrilamida) utilizando el sistema de electroforesis *Mini-Protean Tetra* (*Bio-Rad*).

La migración se llevó a cabo en un voltaje constante de 120 V hasta que el frente de migración llegó al final del gel. Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La transferencia se llevó a cabo en el sistema semiseco de *Biorad* (*Invitrogen*®) a un amperaje de 100mA por gel durante 1 h.

#### - Inmunodetección y análisis densitométrico.

Las membranas fueron bloqueadas con “tampón de bloqueo” (descrito anteriormente) durante 30 s. A continuación, se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente diluido en “tampón de bloqueo”, durante toda la noche a 4 °C. Las características de los anticuerpos utilizados se indican en la Tabla 4. A continuación, se dieron 3 a 4 lavados de 5 min con PBS-T (“tampón de lavado”) a las membranas y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (*Amershan*) ya descritos anteriormente, diluido en tampón PBS-T.

Finalmente, las membranas se lavaron 3 veces 5 minutos con “tampón de lavado”. El revelado de la peroxidasa se realizó con un kit basado en quimioluminiscencia y películas auto-radiográficas. Tras el revelado, las películas se escanearon y las imágenes obtenidas fueron procesadas con el programa *ScionImage 4.0.3* para realizar el análisis cuantitativo de las bandas inmunorreactivas mediante la cuantificación de la densidad óptica de cada una. Para normalizar la cantidad de proteínas de las diferentes condiciones, se utilizó la señal obtenida mediante western blot de la tubulina.

## **7.5 INMUNOPRECIPITACIÓN**

Es una técnica cuya finalidad es aislar una proteína determinada, Sam68 en nuestro caso, y concentrarla para posteriormente detectarla por inmunodetección (Western-blotting). Se usó esta técnica para la determinación de la fosforilación de Sam68 ya que no existe en el mercado ningún anticuerpo comercial específico para ello.

1. En primer lugar los lisados celulares fueron igualados en cantidad de proteína (0,5 mg) y se añadió el anticuerpo primario a una concentración saturante (1ug) durante 3 h a 4°C bajo rotación constante.

2. Ahora se añaden 50 ul de proteína G-sefarosa a los complejos inmunes formados y se incuban durante una hora con rotación constante a 4°C.
3. Los inmunoprecipitados se centrifugan 5 minutos a 13.000 r.p.m. a 4°C.
4. Se retira el sobrenadante y se añade 1 ml y se centrifuga a 13000 rpm, repitiendo el proceso 3 veces.
5. Al pellet resultante se añaden 70 ul de tampón de carga de electroforesis con DTT (100 nM).
6. Se calientan las muestras a 95°C durante 5 minutos.
7. El sobrenadante se puede utilizar para inmunodetección por western-blotting.

## 7.6 **OIL RED**

Para ver la acumulación de lípidos se usó el método del “*oil-red*”, un sencillo método que se basa en la unión de un colorante, de color rojo, con los lípidos presentes del cultivo. Protocolo:

1. Eliminar el medio y lavar con PBS.
2. Anadir para-formaldehido (al 4%) e incubar durante 30 min a temperatura ambiente.
3. Eliminar el para-formaldehido con la ayuda de una pipeta.
4. Lavar las placas con isopropanol al 60%.
5. Dejar que las placas se sequen completamente.
6. Anadir la solución de trabajo de *Oil Red* durante 30 min.
7. Eliminar todo el *Oil Red* y añadir agua inmediatamente.
8. Lavar con agua 4-6 veces.
9. Montar las placas con *Fluoromount-C* (*Southernbiotech*).
10. Observar las células en el microscopio de campo visible.

## 7.7 CUANTIFICACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS

Para la determinación de triglicéridos en los cultivos celulares se usó el analizador multicanal de *Roche: Cobas Integra 6000™*; capaz de cuantificar triglicéridos. En este caso se preparó una dilución 1/100 de los lisados celulares (ver apartado “obtención de los extractos proteicos”) para cada una de las condiciones.

La reacción enzimática que se lleva a cabo es:

- Triglicéridos + 3 H<sub>2</sub>O  $\longrightarrow$  glicerol + 3 RCOOH
- Glicerol + ATP  $\longrightarrow$  glicerol-3-fosfato + ADP
- Glicerol-3-fosfato + O<sub>2</sub>  $\longrightarrow$  dihidroxiacetonafosfato + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 4-aminofenazona + 4-clorofenol + Peroxidasa  $\longrightarrow$  4-(p-benzoquinona-monoimino)-fenazona + 2 H<sub>2</sub>O + HCl

## 8. ESTADÍSTICA

Los resultados obtenidos en esta tesis fueron repetidos 3 veces en experimentos independientes y están expresados como medias  $\pm$  las desviaciones estándar (SD). El análisis estadístico fue llevado a cabo usando el programa *Sigma-Plot*.

# RESULTADOS



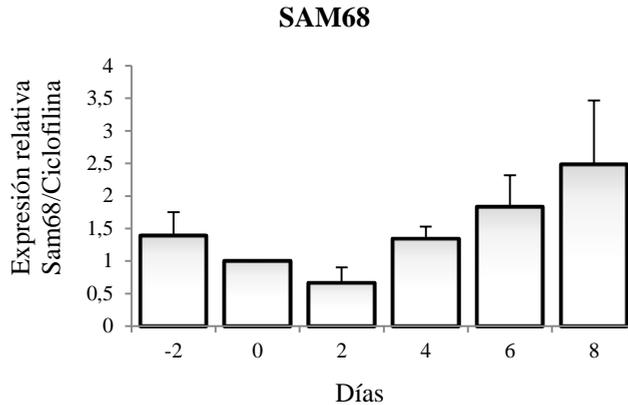
## **IV. RESULTADOS**

### **1. NIVELES DE SAM 68 DURANTE LA ADIPOGÉNESIS**

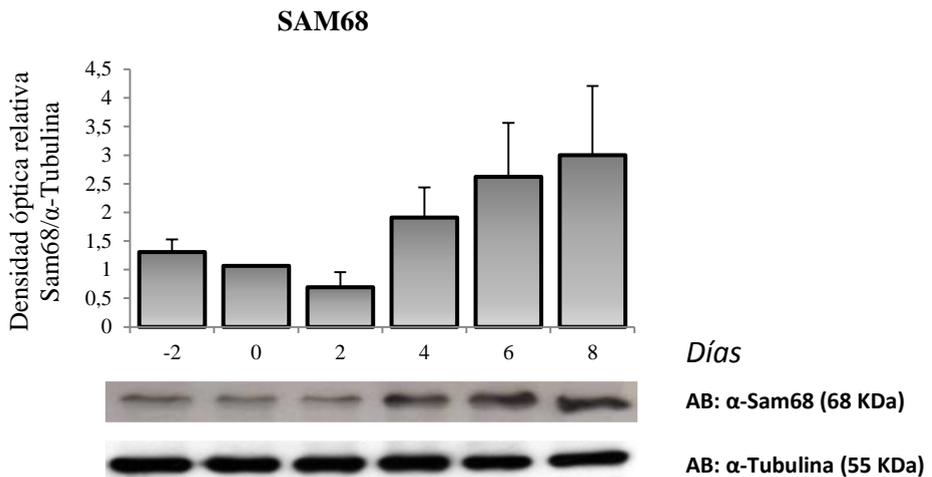
Para caracterizar el patrón de expresión normal de Sam68 a lo largo del proceso de diferenciación del adipocito se usó la línea celular 3T3-L1 de preadipocitos murinos. Dos días después de la confluencia, se cambia el medio de crecimiento por un medio que incluye todos los factores necesarios para inducir la diferenciación, como son la dexametasona, isobutilmetilxantina y la insulina. Después de dos días de incubación se vuelve a cambiar el medio para utilizar el medio de crecimiento suplementado sólo con insulina. Durante el proceso se cambia el medio de las células cada dos días, hasta la completa diferenciación celular que suele estar comprendida entre el 7° y el 9° día después de añadir el estímulo de diferenciación.

Los resultados obtenidos, tanto por qPCR como por western-blot, que se muestran en las Figuras 1 y 2 indican que los preadipocitos tomados dos días antes de inducir la diferenciación expresan mayor cantidad de ARNm de Sam68 que en los días 0 y +2 donde la expresión decae alrededor de 2 veces. A partir del día 2 los preadipocitos comienzan a mostrar un significativo incremento hasta llegar al día 8 donde el nivel alcanza el valor el máximo con más del doble que el nivel del día 0 que fue tomado como día de referencia.

Para comprobar si estos niveles de expresión del ARNm de Sam68 tenían su equivalente en proteína comprobamos mediante western-blotting los niveles de Sam68 en los lisados de células 3T3-L1 obtenidos en las mismas condiciones que los registrados con qPCR. Como puede verse en la densitometría de la Figura 2 las diferencias en los niveles de proteína de Sam68 son equivalentes a los resultados de qPCR. También se puede ver el mismo incremento en la expresión a partir del día +2 hasta el final de la diferenciación tanto de ARNm como en los niveles de proteína. Por tanto, los resultados de qPCR y western-blotting muestran que la expresión de Sam68 tiene un mínimo hacia el comienzo de la diferenciación alcanzando sus mayores niveles al final de la diferenciación.



**Figura 1.** Expresión relativa de Sam68 a lo largo de la diferenciación. Se cultivaron las 3T3-L1 con medio de crecimiento hasta el día 0, donde se añadió el cóctel de diferenciación, durante 2 días, con Dexametasona (DXM 250nM), isobutilmetilxantino (IBMX 500nM) e insulina (500nM). Continuamos hasta la completa diferenciación con medio de crecimiento más insulina (500nM). Se aisló el ARN en cada una de las condiciones para posterior detección de los niveles de ARNm de Sam68 por qPCR. Las barras de error representan la media  $\pm$  error estándar de la media de 3 experimentos independientes.

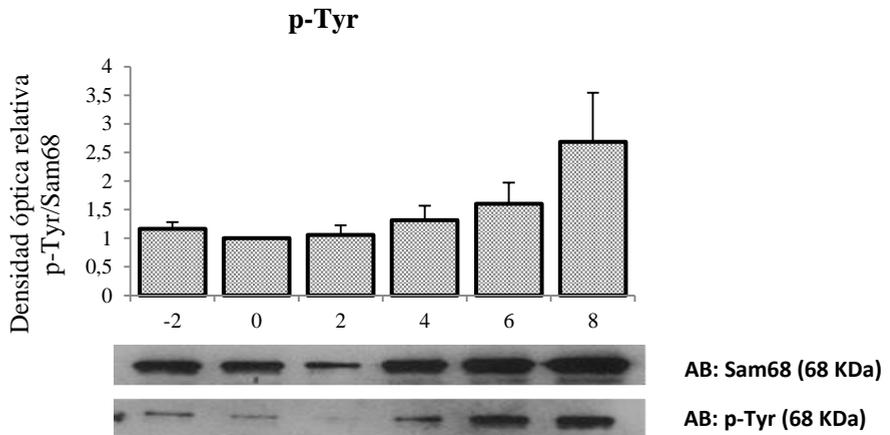


**Figura 2.** Análisis por western blot de Sam68 a lo largo de la diferenciación. Los cultivos se mantuvieron con medio de crecimiento hasta el día 0, donde se añadió el cóctel de diferenciación, durante 2 días, con Dexametasona (DXM 250nM), isobutilmetilxantino (IBMX 500nM) e insulina (500nM). Continuamos hasta la completa diferenciación con medio de crecimiento más insulina (500nM). Las células fueron lisadas en cada uno de los días indicados, sus proteínas separadas mediante electroforesis y la detección se hizo mediante western-blot usando el anticuerpo  $\alpha$ -Sam68. Las barras de error representan la media  $\pm$  error estándar de la media de 3 experimentos independientes.

## 2. FOSFORILACIÓN EN TIROSINA DE SAM68

Por primera vez se cuantificará la fosforilación en tirosina de Sam68 durante la adipogénesis. Debido a que no existe ningún anticuerpo comercial para la detección de fosforilación de Sam68 se tuvo que usar la técnica de inmunoprecipitación, que realiza un aislamiento de una proteína en particular, en nuestro caso Sam68. Para este estudio nos pareció fundamental, aparte de conocer los niveles de expresión y de proteínas, saber el estado de fosforilación de Sam68 durante la adipogénesis. Nuestro grupo ya publicó anteriormente que dicho estado era determinante para concretar qué función podría desempeñar esta proteína ya que ejerce roles muy diferentes según su estado de fosforilación.

En la Figura 3 podemos ver los valores de fosforilación en tirosina que presenta Sam68 a lo largo de una diferenciación en las células 3T3-L1. Estos se mantienen bajos y estables en las 3 primeras condiciones mientras que a partir de entonces parece que la fosforilación en tirosina de Sam68 se dispara gradualmente en cada una de las condiciones restantes hasta alcanzar el máximo, a día 8, con valores que triplican los vistos en las 3 primeras condiciones.

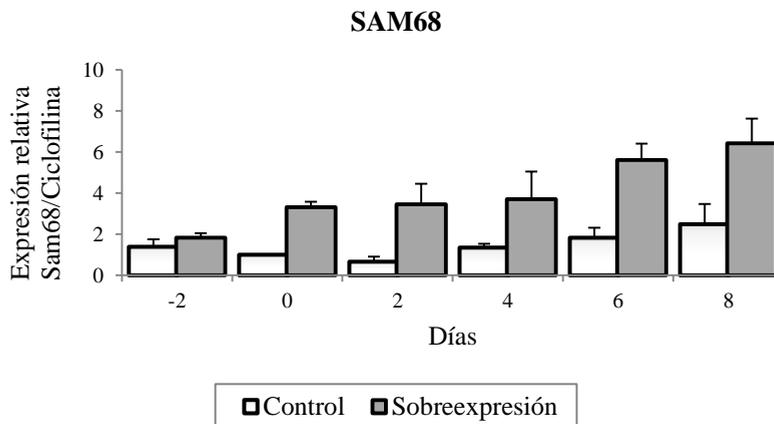


**Figura 3:** Análisis por western blot de una inmunoprecipitación de Sam68 con 4G10. Se puede ver la tirosín-fosforilación de Sam68 a lo largo de la diferenciación. Los cultivos se mantuvieron con medio de crecimiento hasta el día 0, donde se añadió el cóctel de diferenciación, durante 2 días, con Dexametasona (DXM 250nM), isobutilmetilxantino (IBMX 500nM) e insulina (500nM). Continuamos hasta la completa diferenciación con medio de crecimiento más insulina (500nM). Las células fueron lisadas en cada uno de los días indicados, después se inmunoprecipitaron sus proteínas con Sam68 separadas mediante electroforesis y la detección se hizo mediante western-blot usando el anticuerpo  $\alpha$ -p-Tyr (4G10) y  $\alpha$ -Sam68 como control. Las barras de error representan la media  $\pm$  error estándar de la media de 3 experimentos independientes.

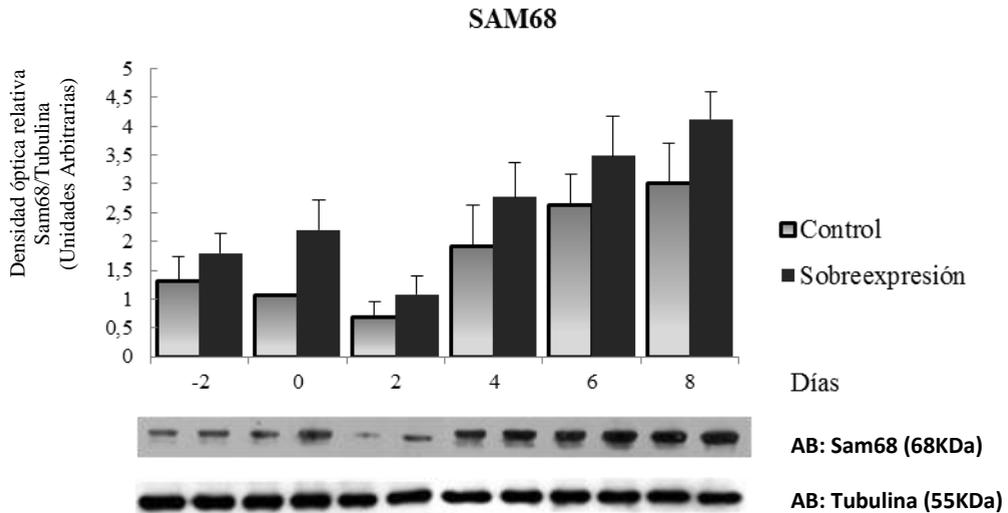
### **3. EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE SAM68 DURANTE LA DIFERENCIACIÓN**

#### *SAM68*

Para estudiar el papel que Sam68 puede tener en la adipogénesis se transfectaron las células 3T3-L1 con el vector Sam68-PCDNA3 el día previo a la inducción de la diferenciación (día -1). Los resultados que se muestran en la Figura 4 reflejan el patrón de expresión génica a lo largo de todo el proceso de diferenciación cuando se sobreexpresa Sam68. En ella vemos como los niveles de expresión se mantienen en una tendencia ascendente hasta llegar al máximo en la última condición, con valores que duplican a los encontrados a día 0. Con respecto a los niveles de proteína, vemos reflejado en la Figura 5 los datos de sobreexpresión, por western-blot, de Sam68. Se observa un patrón similar al encontrado en la expresión génica de Sam68, aumentando significativamente en cada una de las condiciones hasta alcanzar un máximo al final del proceso. Con estos datos se confirma que la sobreexpresión de Sam68, realizada en el día -1 antes de añadir el cóctel de diferenciación, ha provocado un aumento en los niveles de expresión y cantidad de proteína en todas las condiciones analizadas.



**Figura 4:** Expresión relativa de Sam68 a lo largo de la diferenciación. Se cultivaron las 3T3-L1 con medio de crecimiento hasta el día 0, donde se añadió el cóctel de diferenciación, durante 2 días, con Dexametasona (DXM 250nM), isobutilmetilxantino (IBMX 500nM) e insulina (500nM). Continuamos hasta la completa diferenciación con medio de crecimiento más insulina (500nM). Se aisló el ARN en cada una de las condiciones para posterior detección de los niveles de ARNm de Sam68 por qPCR. Para la sobreexpresión se transfectaron las células 3T3-L1 con el vector Sam68-PCDNA3 el día previo a la inducción de la diferenciación (día -1). Las barras de error representan la media  $\pm$  error estándar de la media de 3 experimentos independientes.



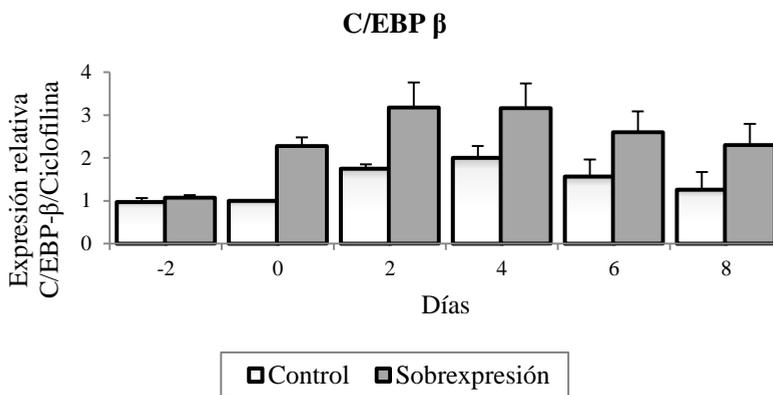
**Figura 5:** Western-blot de Sam68; Se cultivaron las 3T3-L1 con medio de crecimiento hasta el día 0, donde se añadió el cóctel de diferenciación, durante 2 días, con Dexametasona (DXM 250nM), isobutilmetilxantino (IBMX 500nM) e insulina (500nM). Continuamos hasta la completa diferenciación con medio de crecimiento más insulina (500nM). Para la sobreexpresión se transfectaron las células 3T3-L1 con el vector Sam68-PCDNA3 el día previo a la inducción de la diferenciación (día -1). Las células fueron lisadas en cada uno de los días indicados, sus proteínas separadas mediante electroforesis y la detección se hizo mediante western-blot usando el anticuerpo  $\alpha$ -Sam68. Las barras de error representan la media  $\pm$  error estándar de la media de 3 experimentos independientes.

### *C/EBP $\beta$*

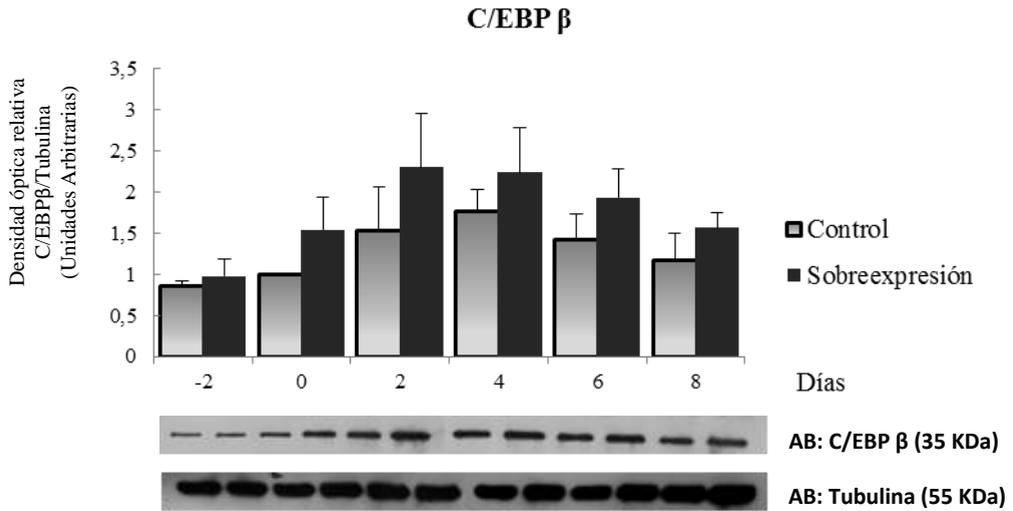
Siguiendo con el mismo procedimiento, nos propusimos estudiar el comportamiento de *C/EBP  $\beta$*  cuando se sobreexpresa Sam68. Dicho factor de transcripción es junto a su homónimo  $\delta$  uno de los principales activadores de la diferenciación, siendo muy importante en las primeras horas después de la inducción y promoviendo la expresión de genes encargados de entrar en la transición de fase G1 a S de la fase de expansión clonal de la diferenciación del adipocito.

En las Figuras 6 y 7 se muestran los resultados obtenidos para *C/EBP  $\beta$* , tanto de expresión génica (Figura 6) como de cantidad de proteína (Figura 7). Los valores de expresión génica encontrados cuando sobreexpresamos Sam68 nos muestran como el patrón a lo largo de la diferenciación no cambia, y los niveles de sobreexpresión se mantienen más altos que en el control en todas las condiciones, oscilando entre

valores con más del doble justo después de la transfección con el plásmido, hasta un mínimo del 60% extra alcanzado a día 2. Con respecto al experimento de western-blot (Figura 7) encontramos que las diferencias entre el control y la sobreexpresión de Sam68 se suavizan: máxima diferencia a día 0 con un 50% más que el control mientras que la diferencia mínima se ve en última condición. También se observa que los niveles sobreexpresados mantienen el mismo patrón general que las células control a lo largo de toda la diferenciación.



**Figura 6:** Expresión relativa de C/EBP $\beta$  a lo largo de la diferenciación. Se cultivaron las 3T3-L1 con medio de crecimiento hasta el día 0, donde se añadió el cóctel de diferenciación, durante 2 días, con Dexametasona (DXM 250nM), isobutilmetilxantino (IBMX 500nM) e insulina (500nM). Continuamos hasta la completa diferenciación con medio de crecimiento más insulina (500nM). Se aisló el ARN en cada una de las condiciones para posterior detección de los niveles de ARNm de C/EBP $\beta$  por qPCR. Para la sobreexpresión se transfectaron las células 3T3-L1 con el vector Sam68-PCDNA3 el día previo a la inducción de la diferenciación (día -1). Las barras de error representan la media  $\pm$  error estándar de la media de 3 experimentos independientes.



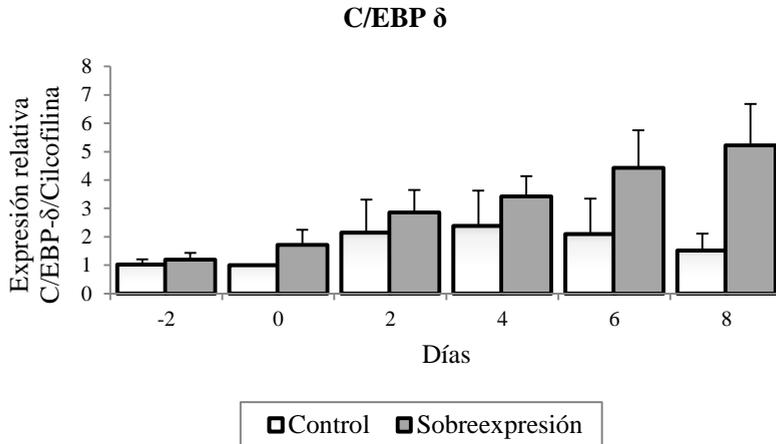
**Figura 7:** Western-blot de C/EBP $\beta$ ; Se cultivaron las 3T3-L1 con medio de crecimiento hasta el día 0, donde se añadió el cóctel de diferenciación, durante 2 días, con Dexametasona (DXM 250nM), isobutilmetilxantino (IBMX 500nM) e insulina (500nM). Continuamos hasta la completa diferenciación con medio de crecimiento más insulina (500nM). Para la sobreexpresión se transfectaron las células 3T3-L1 con el vector Sam68-PCDNA3 el día previo a la inducción de la diferenciación (día -1). Las células fueron lisadas en cada uno de los días indicados, sus proteínas separadas mediante electroforesis y la detección se hizo mediante western-blot usando el anticuerpo  $\alpha$ - C/EBP $\beta$ . Las barras de error representan la media  $\pm$  error estándar de la media de 3 experimentos independientes.

### C/EBP $\delta$

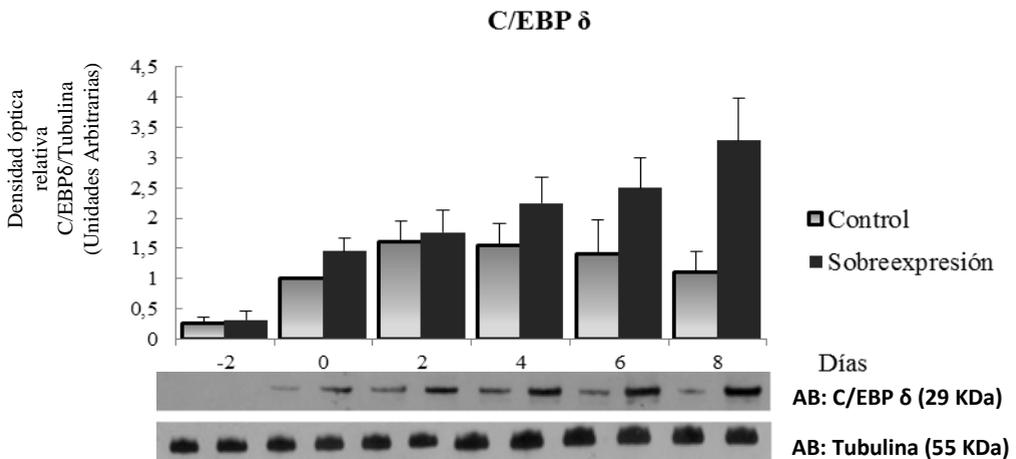
Siguiendo con los factores de transcripción estudiados, quisimos ver si la expresión de C/EBP  $\delta$  se afectaba por la sobreexpresión de Sam68. Este factor de transcripción, tal y como hablamos en el apartado anterior, parece tener un papel primordial en las fases más tempranas de la diferenciación del adipocito, al igual que C/EBP- $\beta$ . Entre las funciones más importantes extraemos su papel fundamental en la expansión clonal mitótica y en la activación de genes como C/EBP  $\beta$  y C/EBP  $\alpha$ .

En la Figura 8 se observa una tendencia al alza en cada una de las condiciones, con una diferencia máxima en el último día registrado. De los factores de transcripción estudiados en esta tesis es el único gen donde se observa como la sobreexpresión de Sam68 parece provocar un cambio de patrón con respecto a su control a lo largo de la diferenciación, con el máximo alcanzado en la última condición. Al igual que en los casos anteriores se observa (Figura 9) que los niveles de proteína obtenidos mediante densitometría óptica de los western-blots de lisados celulares, se

correlacionan bastante bien con los obtenidos por qPCR, con un patrón muy similar y valores algo inferiores a los encontrados en expresión.



**Figura 8:** Expresión relativa de C/EBP $\delta$  a lo largo de la diferenciación. Se cultivaron las 3T3-L1 con medio de crecimiento hasta el día 0, donde se añadió el cóctel de diferenciación, durante 2 días, con Dexametasona (DXM 250nM), isobutilmetilxantino (IBMX 500nM) e insulina (500nM). Continuamos hasta la completa diferenciación con medio de crecimiento más insulina (500nM). Se aisló el ARN en cada una de las condiciones para posterior detección de los niveles de ARNm de C/EBP $\delta$  por qPCR. Para la sobreexpresión se transfectoron las células 3T3-L1 con el vector Sam68-PCDNA3 el día previo a la inducción de la diferenciación (día -1). Las barras de error representan la media  $\pm$  error estándar de la media de 3 experimentos independientes.

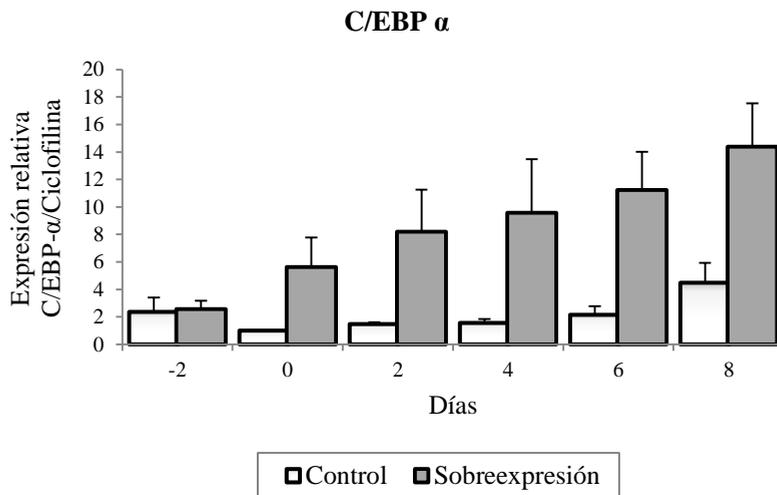


**Figura 9:** Western-blot de C/EBP $\delta$ ; Se cultivaron las 3T3-L1 con medio de crecimiento hasta el día 0, donde se añadió el cóctel de diferenciación, durante 2 días, con Dexametasona (DXM 250nM), isobutilmetilxantino (IBMX 500nM) e insulina (500nM). Continuamos hasta la completa diferenciación con medio de crecimiento más insulina (500nM). Para la sobreexpresión se transfectoron las células 3T3-L1 con el vector Sam68-PCDNA3 el día previo a la inducción de la diferenciación (día -1). Las células fueron lisadas en cada uno de los días indicados, sus proteínas separadas mediante electroforesis y la detección se hizo mediante western-blot usando el anticuerpo  $\alpha$ -C/EBP $\delta$ . Las barras de error representan la media  $\pm$  error estándar de la media de 3 experimentos independientes.

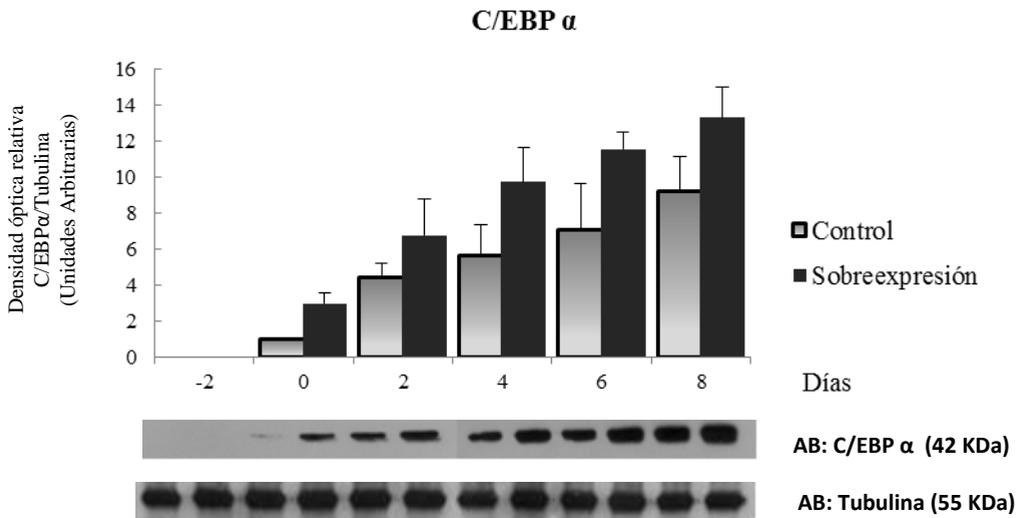
*C/EBP  $\alpha$* 

En la Figura 10 se muestran los datos de expresión obtenidos de C/EBP $\alpha$ , otro de los factores de transcripción que se inducen de forma secuencial tras la expresión de los factores C/EBP beta y delta, así el incremento en la expresión son mayores en tiempos tardíos de la diferenciación. Se comprueba que cuando se sobreexpresa Sam68 los valores de diferencia con el control se mantienen estables en la mayoría de las condiciones, en un rango entre 5 y 6 veces más, sin duda la diferencia más amplia con respecto a los demás genes estudiados en esta tesis.

Con respecto a los resultados de western-blot (Figura 11) se muestran diferencias mucho más suaves que los niveles encontrados cuando se sobreexpresa Sam68 con respecto al control tal y como encontramos en anteriores genes estudiados. La dinámica encontrada es prácticamente la misma que la vista en las células control con la diferencia que en la condición previa a la diferenciación se hayan valores casi mínimos de proteínas, mientras que en la gráfica de expresión, en ese mismo estado de preadipocito, los valores son más altos.



**Figura 10:** Expresión relativa de C/EBP $\alpha$  a lo largo de la diferenciación. Se cultivaron las 3T3-L1 con medio de crecimiento hasta el día 0, donde se añadió el cóctel de diferenciación, durante 2 días, con Dexametasona (DXM 250nM), isobutilmetilxantino (IBMX 500nM) e insulina (500nM). Continuamos hasta la completa diferenciación con medio de crecimiento más insulina (500nM). Se aisló el ARN en cada una de las condiciones para posterior detección de los niveles de ARNm de C/EBP $\alpha$  por qPCR. Para la sobreexpresión se transfectaron las células 3T3-L1 con el vector Sam68-PCDNA3 el día previo a la inducción de la diferenciación (día -1). Las barras de error representan la media  $\pm$  error estándar de la media de 3 experimentos independientes.

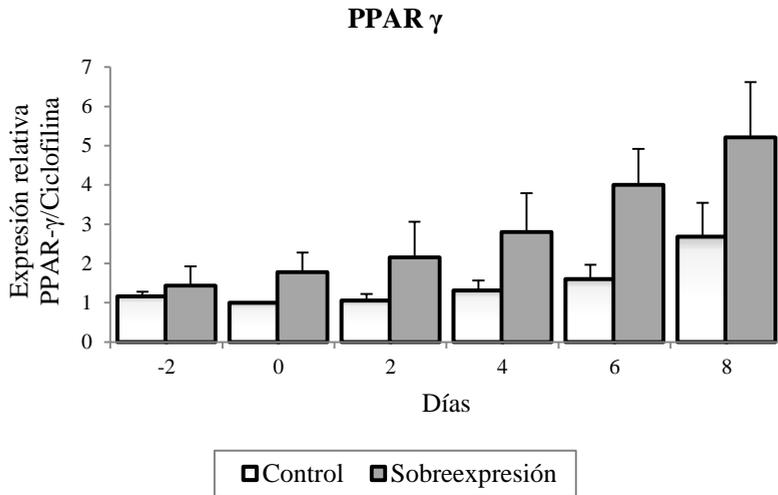


**Figura 11:** Western-blot de C/EBP $\alpha$ ; Se cultivaron las 3T3-L1 con medio de crecimiento hasta el día 0, donde se añadió el cóctel de diferenciación, durante 2 días, con Dexametasona (DXM 250nM), isobutilmetilxantino (IBMX 500nM) e insulina (500nM). Continuamos hasta la completa diferenciación con medio de crecimiento más insulina (500nM). Para la sobreexpresión se transfectoron las células 3T3-L1 con el vector Sam68-PCDNA3 el día previo a la inducción de la diferenciación (día -1). Las células fueron lisadas en cada uno de los días indicados, sus proteínas separadas mediante electroforesis y la detección se hizo mediante western-blot usando el anticuerpo  $\alpha$ -C/EBP $\alpha$ . Las barras de error representan la media  $\pm$  error estándar de la media de 3 experimentos independientes.

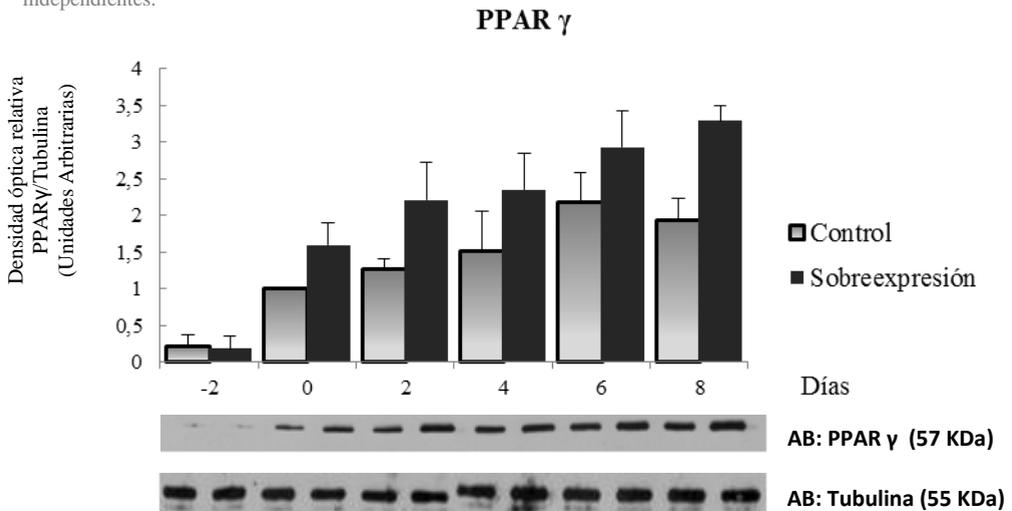
## PPAR $\gamma$

Por último nos centramos en el factor de transcripción que finalmente guía la diferenciación final del preadipocito: PPAR-gamma. En la Figura 12 se muestran los valores recogidos por qPCR, cuando se sobreexpresa Sam68. Como puede verse los valores van aumentando gradualmente hasta llegar a casi cuadruplicar dichos valores en el día 8. La Figura 13 representa por western-blot los niveles de PPAR $\gamma$  y reflejan un comportamiento casi idéntico al hallado en la gráfica anterior.

Para terminar con los resultados de sobreexpresión se analiza la gráfica que muestra los niveles de proteína por western-blot. Como en casi todos los casos anteriores se puede ver que la dinámica a lo largo de la diferenciación es casi idéntica que la encontrada por qPCR. Además, solo se observa una diferencia algo menos acentuada en las diferentes condiciones estudiadas, que las vistas en expresión génica, corroborando la linealidad observada entre ambos experimentos.



**Figura 12:** Expresión relativa de PPAR $\gamma$  a lo largo de la diferenciación. Se cultivaron las 3T3-L1 con medio de crecimiento hasta el día 0, donde se añadió el cóctel de diferenciación, durante 2 días, con Dexametasona (DXM 250nM), isobutilmetilxantino (IBMX 500nM) e insulina (500nM). Continuamos hasta la completa diferenciación con medio de crecimiento más insulina (500nM). Se aisló el ARN en cada una de las condiciones para posterior detección de los niveles de ARNm de PPAR $\gamma$  por qPCR. Para la sobreexpresión se transfectaron las células 3T3-L1 con el vector Sam68-PCDNA3 el día previo a la inducción de la diferenciación (día -1). Las barras de error representan la media  $\pm$  error estándar de la media de 3 experimentos independientes.



**Figura 13:** Western-blot de PPAR $\gamma$ ; Se cultivaron las 3T3-L1 con medio de crecimiento hasta el día 0, donde se añadió el cóctel de diferenciación, durante 2 días, con Dexametasona (DXM 250nM), isobutilmetilxantino (IBMX 500nM) e insulina (500nM). Continuamos hasta la completa diferenciación con medio de crecimiento más insulina (500nM). Para la sobreexpresión se transfectaron las células 3T3-L1 con el vector Sam68-PCDNA3 el día previo a la inducción de la diferenciación (día -1). Las células fueron lisadas en cada uno de los días indicados, sus proteínas separadas mediante electroforesis y la detección se hizo mediante western-blot usando el anticuerpo  $\alpha$ -PPAR $\gamma$ . Las barras de error representan la media  $\pm$  error estándar de la media de 3 experimentos independientes).

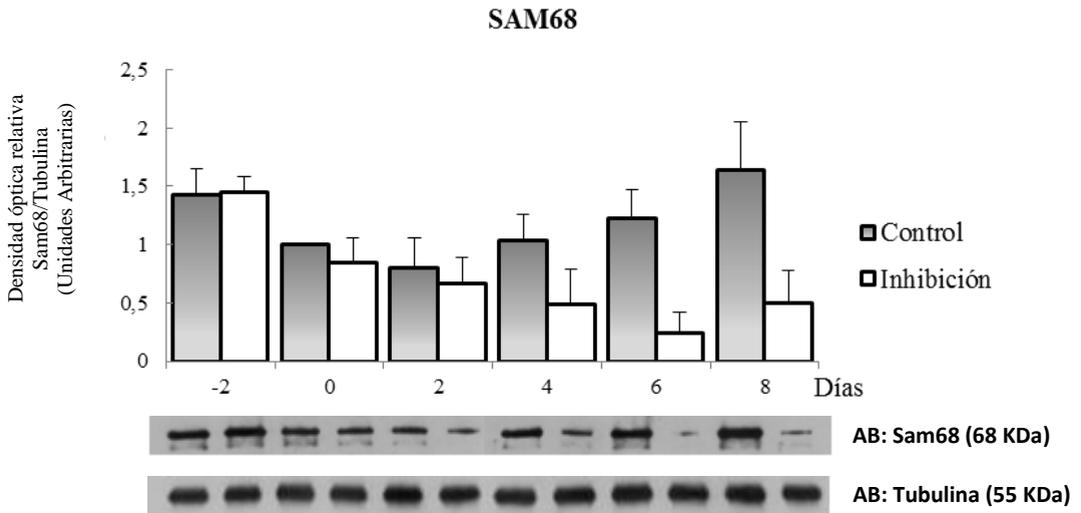
En resumen podemos decir que la sobreexpresión de Sam68 afecta de una forma importante, tanto en expresión génica como en cantidad de proteína, a los factores de transcripción C/EBP aquí estudiados ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ) y de PPAR $\gamma$  durante el proceso de la diferenciación del adipocito murino; haciendo variar positivamente el patrón habitual de expresión de cada uno de ellos.

#### **4. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE SAM68 DURANTE LA DIFERENCIACIÓN**

##### *SAM68*

Para completar el presente estudio y conocer algo más sobre el posible papel que Sam68 puede tener en la adipogénesis se transfectaron las células con un SiRNA de Sam68 para conseguir una inhibición durante el máximo tiempo posible de la diferenciación del adipocito. Para poder comparar los resultados, esta técnica se realizó en las mismas condiciones que se hizo con la sobreexpresión, es decir, el día previo a la inducción de la diferenciación (día -1).

Los resultados que se muestran en la Figura 14 reflejan el patrón de cantidad de proteína a lo largo de toda la diferenciación cuando se inhibe Sam68. En él se observa cómo la disminución de Sam68 se va acrecentando con los días, pasando de valores de inhibición del 15-20% en las primeras condiciones post-transfección a un aumento significativo en los siguientes, alcanzando un máximo del 80% con respecto al control en la penúltima condición estudiada; por lo que se consiguió el objetivo de reducir la cantidad de Sam68 a lo largo de toda la diferenciación.



**Figura 14:** Western-blot de Sam68; Se cultivaron las 3T3-L1 con medio de crecimiento hasta el día 0, donde se añadió el cóctel de diferenciación, durante 2 días, con Dexametasona (DXM 250nM), isobutilmetilxantino (IBMX 500nM) e insulina (500nM). Continuamos hasta la completa diferenciación con medio de crecimiento más insulina (500nM). Para la inhibición se transfectaron las células 3T3-L1 con el SiRNA para Sam68 el día previo a la inducción de la diferenciación (día -1). Las células fueron lisadas en cada uno de los días indicados, sus proteínas separadas mediante electroforesis y la detección se hizo mediante western-blot usando el anticuerpo  $\alpha$ -Sam68. Las barras de error representan la media  $\pm$  error estándar de la media de 3 experimentos independientes.

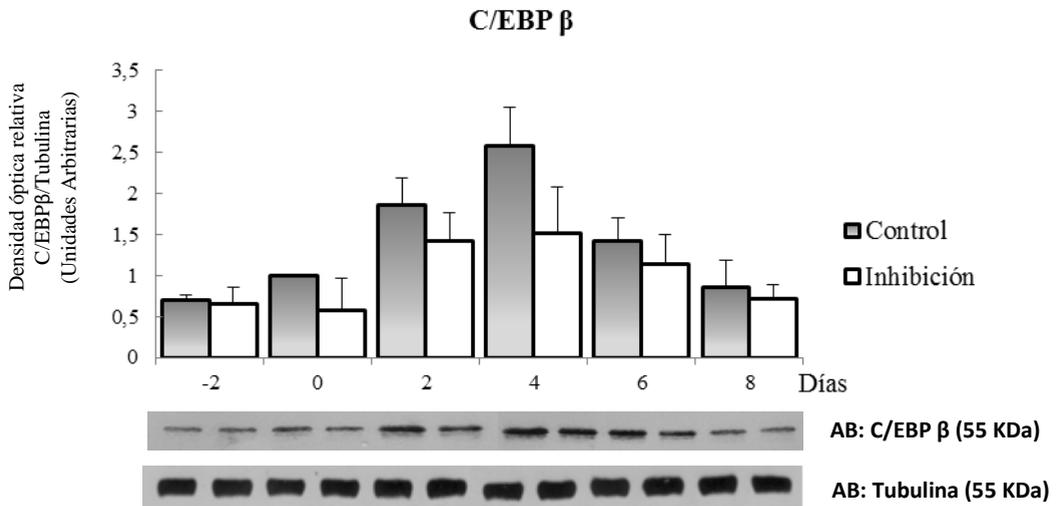
### *C/EBP $\beta$*

Siguiendo con el mismo procedimiento, nos propusimos estudiar el comportamiento de C/EBP- $\beta$  cuando se inhibe Sam68. Recordemos que dicho factor de transcripción es junto a su homónimo  $\delta$  uno de los principales activadores de la diferenciación, siendo muy importante en las primeras horas de inducción y promoviendo la expresión de genes encargados de entrar en la transición de fase G1 a S de la etapa de expansión clonal de la diferenciación del adipocito.

En la Figura 15 se muestra, por western-blot, los valores alcanzados por C/EBP- $\beta$  cuando se inhibe Sam68 a lo largo de la diferenciación. Al contrario de lo que ocurre en el anterior caso, donde se encuentran las máximas diferencias en las últimas condiciones, aquí

observamos lo contrario. Aparecen unos niveles de inhibición mayores en los días 0, 2 y 4, llegado al 40% en este último caso.

Aunque el cambio en la disminución de expresión es bastante claro queda patente que no existe una variación en la dinámica general de C/EBP  $\beta$  cuando se inhibe Sam68.



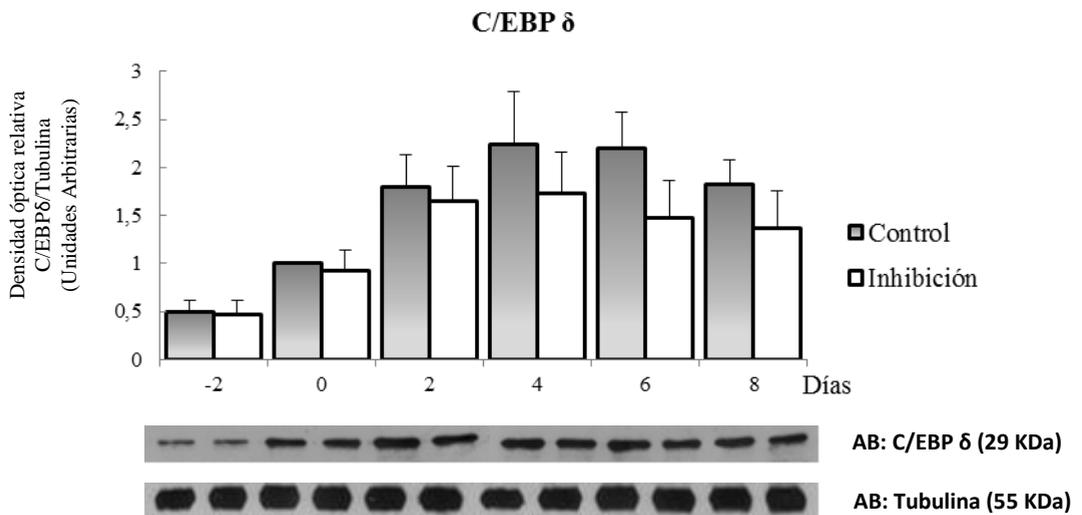
**Figura 15:** Western-blot de C/EBP  $\beta$ ; Se cultivaron las 3T3-L1 con medio de crecimiento hasta el día 0, donde se añadió el cóctel de diferenciación, durante 2 días, con Dexametasona (DXM 250nM), isobutilmetilxantino (IBMX 500nM) e insulina (500nM). Continuamos hasta la completa diferenciación con medio de crecimiento más insulina (500nM). Para la inhibición se transfectaron las células 3T3-L1 con el SiRNA para Sam68 el día previo a la inducción de la diferenciación (día -1). Las células fueron lisadas en cada uno de los días indicados, sus proteínas separadas mediante electroforesis y la detección se hizo mediante western-blot usando el anticuerpo  $\alpha$ -C/EBP  $\beta$ . Las barras de error representan la media  $\pm$  error estándar de la media de 3 experimentos independientes.

### **C/EBP $\delta$**

Siguiendo con los factores de transcripción estudiados, también quisimos continuar viendo si la expresión de C/EBP- $\delta$  se afectaba o alteraba por la inhibición de Sam68. Este factor de transcripción, tal y como hablamos en el apartado anterior, parece tener un papel primordial en las fases más tempranas de la diferenciación del adipocito, al igual que ocurre con C/EBP- $\beta$ . Recordamos que entre las funciones más importantes extraemos su papel fundamental en la expansión clonal mitótica y en la activación de genes tales como C/EBP- $\beta$  y C/EBP- $\alpha$ .

Se muestra más abajo la Figura 16 de esta tesis, donde se ven los valores alcanzados de C/EBP $\delta$  cuando se inhibe Sam68 en la diferenciación adipocitaria. Se puede ver que las diferencias con el control son menos evidentes que en el anterior caso, por lo que parece que una disminución de Sam68 afecta a esta proteína de una forma menos clara que C/EBP- $\beta$ .

Tal y como se refleja en la gráfica, podemos confirmar que la dinámica general a todo lo largo de la diferenciación también se mantiene, al contrario de lo visto en el mismo caso con la sobreexpresión de Sam68, por lo que resultaría interesante conocer algo más sobre los posibles mecanismos de actuación de esta proteína, sin duda la menos conocida de todas las vistas en este estudio.



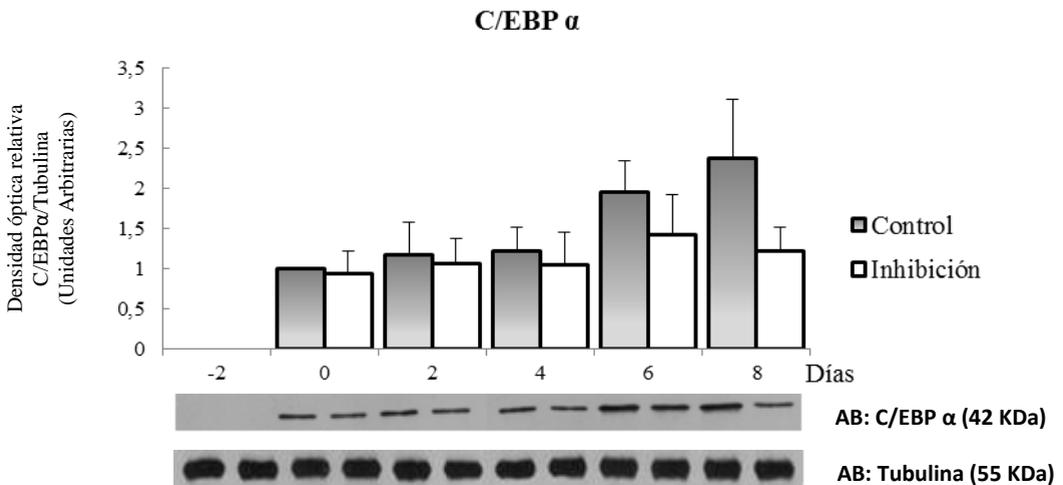
**Figura 16:** Western-blot de C/EBP  $\delta$ ; Se cultivaron las 3T3-L1 con medio de crecimiento hasta el día 0, donde se añadió el cóctel de diferenciación durante 2 días, con Dexametasona (DXM 250nM), isobutilmetilxantino (IBMX 500nM) e insulina (500nM). Continuamos hasta la completa diferenciación con medio de crecimiento más insulina (500nM). Para la inhibición se transfectaron las células 3T3-L1 con el SiRNA para Sam68 el día previo a la inducción de la diferenciación (día -1). Las células fueron lisadas en cada uno de los días indicados, sus proteínas separadas mediante electroforesis y la detección se hizo mediante western-blot usando el anticuerpo  $\alpha$ -C/EBP  $\delta$ . Las barras de error representan la media  $\pm$  error estándar de la media de 3 experimentos independientes.

*C/EBP- $\alpha$* 

En la Figura 17 se muestran los datos de cantidad de C/EBP- $\alpha$ , otro de los factores de transcripción más importantes descritos hasta la fecha en el proceso de diferenciación del preadipocito murino y humano. También podemos ahora mencionar de nuevo el papel fundamental que tanto C/EBP- $\alpha$  junto con PPAR- $\gamma$  llevan a cabo en la activación de los genes imprescindibles para desarrollar todo el metabolismo del adipocito maduro.

En este caso llama la atención que solo en las dos últimas condiciones parece haber una diferencia considerable, ya que en todos los días estudiados anteriores la inhibición de Sam68 no parece provocar una disminución de C/EBP $\alpha$  más allá del 10-15%. Sin embargo en el octavo día se aprecia una reducción de casi el 50% comparado con el control.

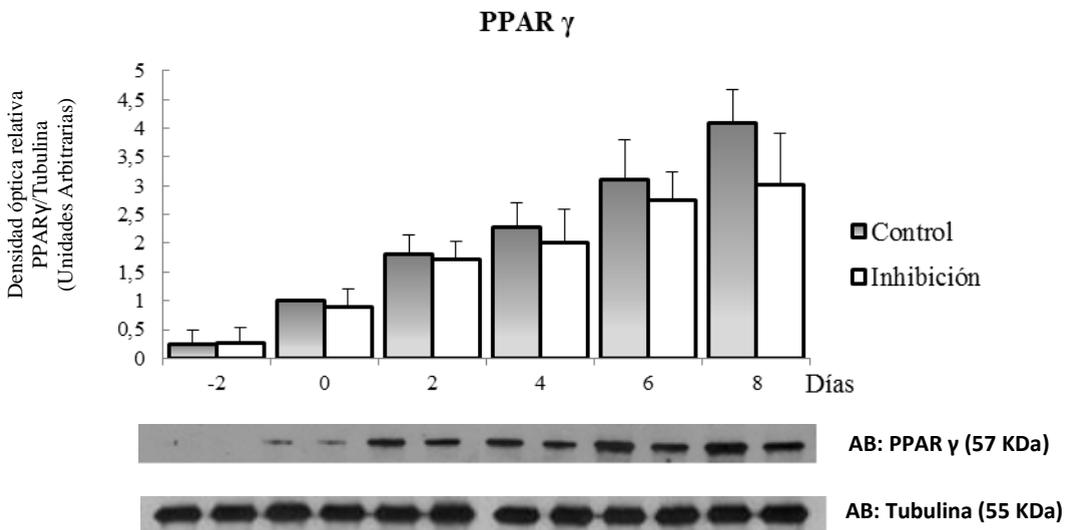
Estudiando el patrón global de C/EBP $\alpha$  con la inhibición de Sam68 se ve cómo los valores se mantienen más o menos estables prácticamente desde el comienzo de la diferenciación. Así a día 0 encontramos casi los mismos niveles de este factor de transcripción que en el último día de estudio.



**Figura 17:** Western-blot de C/EBP $\alpha$ ; Se cultivaron las 3T3-L1 con medio de crecimiento hasta el día 0, donde se añadió el cóctel de diferenciación, durante 2 días, con Dexametasona (DXM 250nM), isobutilmetilxantino (IBMX 500nM) e insulina (500nM). Continuamos hasta la completa diferenciación con medio de crecimiento más insulina (500nM). Para la inhibición se transfectaron las células 3T3-L1 con el SiRNA para Sam68 el día previo a la inducción de la diferenciación (día -1). Las células fueron lisadas en cada uno de los días indicados, sus proteínas separadas mediante electroforesis y la detección se hizo mediante western-blot usando el anticuerpo  $\alpha$ -C/EBP $\alpha$ . Las barras de error representan la media  $\pm$  error estándar de la media de 3 experimentos independientes.

*PPAR- $\gamma$* 

Por último nos centramos en el otro factor de transcripción que parece guiar la diferenciación del preadipocito: PPAR- $\gamma$ . En la Figura 18 se muestran los valores recogidos por “western-blot” cuando se inhibe Sam68. Como en el caso anterior puede verse que los valores van aumentando menos gradualmente que en el control hasta llegar a conseguir una disminución máxima de un 20% en la última condición. Al igual que ocurría también con C/EBP $\alpha$  solo se aprecia una inhibición considerable en los 2 últimos días estudiados.

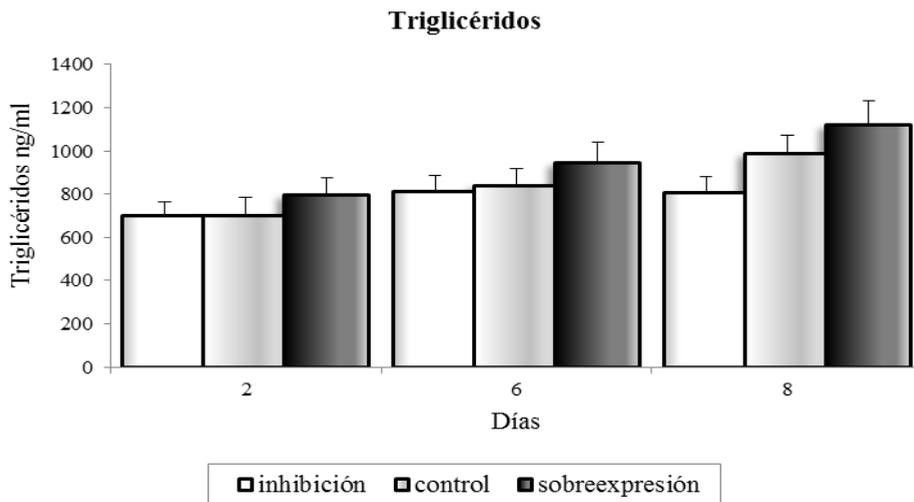


**Figura 18:** Western-blot de PPAR $\gamma$ ; Se cultivaron las 3T3-L1 con medio de crecimiento hasta el día 0, donde se añadió el cóctel de diferenciación, durante 2 días, con Dexametasona (DXM 250nM), isobutilmetilxantino (IBMX 500nM) e insulina (500nM). Continuamos hasta la completa diferenciación con medio de crecimiento más insulina (500nM). Para la inhibición se transfectaron las células 3T3-L1 con el SiRNA para Sam68 el día previo a la inducción de la diferenciación (día -1). Las células fueron lisadas en cada uno de los días indicados, sus proteínas separadas mediante electroforesis y la detección se hizo mediante western-blot usando el anticuerpo  $\alpha$ -PPAR  $\gamma$ . Las barras de error representan la media  $\pm$  error estándar de la media de 3 experimentos independientes.

#### 4. CUANTIFICACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS

Para comprobar que todos estos cambios observados en la expresión génica de alguno de los principales factores de transcripción de la diferenciación del adipocito se traducen en cambios en el metabolismo lipídico, se propuso un experimento de cuantificación de triglicéridos, donde se utilizaron los lisados celulares de cultivos que tanto sobreexpresaban como inhibían Sam68 (usando también el mismo protocolo de diferenciación y de transfección descritos anteriormente). Los resultados se obtuvieron del analizador multicanal de Roche: Cobas Integra 6000™, capaz de medir triglicéridos.

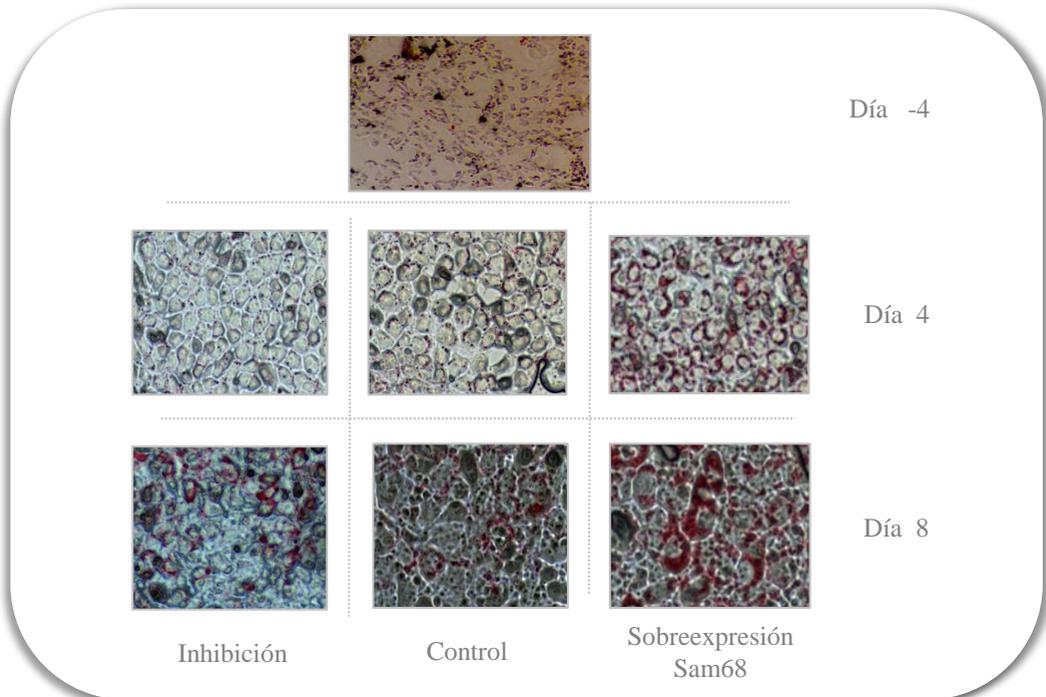
La Figura 19 refleja cómo a partir del día 2, momento en el cual los cultivos dejan de ser suplementados con dexametasona e IBMX, existe una diferencia importante en los valores hallados, incrementándose ligeramente esta diferencia en las dos condiciones siguientes, hasta alcanzar a día 8 un 12% más de triglicéridos en los cultivos donde se sobreexpresa Sam68 mientras que con la inhibición se almacenó un 19% menos de triglicéridos en las células.



*Figura 19.* Representación de los valores de triglicéridos acumulados en las células 3T3-L1 a lo largo de la diferenciación sobreexpresando Sam68. Se cultivaron las células con medio de crecimiento hasta el día 0, donde se añadió el cóctel de diferenciación, durante 2 días, con Dexametasona (DXM 250nM), isobutilmetilxantino (IBMX 500nM) e insulina (500nM). Continuamos hasta la completa diferenciación con medio de crecimiento más insulina (500nM). Para la sobreexpresión e inhibición se transfectaron las células con el vector Sam68-PCDNA3 el día previo a la inducción de la diferenciación (día -1), mientras que para la inhibición se usó SiRNA para Sam68. Los lisados fueron recogidos a días 2, 6 y 8 en una dilución 1/100 y posteriormente analizados por el analizador multicanal Cobas Integra 6000. Las barras de error representan la media  $\pm$  error estándar de la media de 3 experimentos independientes.

## 5. MORFOLOGÍA CELULAR

Con lo visto hasta ahora podemos deducir que Sam68 realmente puede estar modulando todo este proceso, ya que su cambio de expresión parece provocar cambios muy pronunciados tanto en los genes adipogénicos que hemos estudiado como en el metabolismo lipídico. La Figura 20 representa, mediante una técnica de coloración de triglicéridos (Oil Red) los cambios morfológicos registrados en las células a diferentes días (se usó el mismo protocolo de diferenciación descrito anteriormente), comparando los cultivos que sobreexpresan e inhiben Sam68 con su control. Esta figura muestra con claridad, cómo las células de la columna de la izquierda (inhibición) aparecen con una coloración bastante menos marcada (por lo tanto almacenan una menor cantidad de triglicéridos) que sus “hermanas” de la derecha, las cuales sobreexpresan Sam68, todas comparadas con su control correspondiente.



**Figura 20:** Fotos tomadas de microscopio óptico (Axiovert CFL de Zeiss) de cultivos de 3T3-L1 a días -4, +4 y +8 tratadas con “oil-red”. Los cultivos se mantuvieron con medio de crecimiento hasta el día 0, donde se añadió el cóctel de diferenciación, durante 2 días, con Dexametasona (DXM 250nM), isobutilmetilxantino (IBMX 500nM) e insulina (500nM). Continuamos hasta la completa diferenciación con medio de crecimiento más insulina (500nM). Las células fueron fijadas y tratadas con “oil red” en cada uno de los días indicados.



# DISCUSIÓN

---



## V. DISCUSIÓN

Como hemos descrito anteriormente Sam68, es una proteína STAR (transductor de señales y activador del metabolismo de ARN) [90,91] implicada en la transducción de señales y la activación del metabolismo del ARN a través de su dominio de homología KH (homología a hnRNP) [92-94].

Nuestro grupo ha participado en el estudio del papel de Sam68 en diferentes procesos bioquímicos, sobre todo en respuesta a insulina y leptina y en los puntos que tienen en común, como son las vías de señalización MAPK y PI3K [30].

Sam68 fue descrita como una proteína nuclear [217], aunque puede translocarse desde el núcleo al citoplasma donde participa en numerosas vías de señalización. El hecho de que Sam68 esté presente en el citoplasma de células CHO que sobreexpresaban el receptor de insulina, y sobre todo presente casi exclusivamente en el citoplasma de un tipo celular diana de la insulina como es el adipocito, fue suficiente para proponer a Sam68 como una molécula de señalización para el receptor de insulina. De hecho, la estimulación con insulina parece inducir una localización aún mayor en el citoplasma en células CHO-IR, lo cual sugiere que hay suficiente cantidad de Sam68 presente en el citoplasma para jugar su posible papel en la señalización del receptor de insulina. Además, se ha encontrado que Sam68 es fosforilado en tirosina y reclutado para la señalización en respuesta a la leptina [30,130,158].

El proceso de la diferenciación del adipocito, como sabemos, es complejo. C/EBP (CCAAT-enhancer-binding protein)  $\delta$  y  $\beta$  son los primeros factores de transcripción conocidos activos que intervienen en la diferenciación. De hecho, los niveles máximos de expresión de dichos factores se concentran en los primeros días, por lo que se cree que se encargan de dirigir la maduración. La actividad de dichas proteínas controla la expresión de PPAR- $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ) y de C/EBP $\alpha$ , que son los factores de transcripción más importantes en este proceso y que van a activar multitud de genes implicados en las funciones de los adipocitos maduros, que van desde el metabolismo lipídico hasta la secreción de adipocinas; por lo que una vez

que los niveles de C/EBP $\delta$  y  $\beta$  comiencen a disminuir será cuando, tanto PPAR- $\gamma$  como C/EBP- $\alpha$ , tomen la iniciativa y el protagonismo creando y manteniendo el fenotipo maduro [43].

En cuanto a la relación de Sam68 con la adipogénesis se ha visto que Sam68 podría estar implicado en la diferenciación del adipocito. Como se dijo en la introducción, ratones KO de Sam68 presentan una resistencia a la pérdida de hueso con el envejecimiento, a través de un mecanismo donde Sam68 parece regular la diferenciación de células estromales de la médula ósea a adipocitos. Estos ratones parecen preservar su masa ósea con el envejecimiento en contraste con ratones control. Además se ha visto que los fibroblastos de estos ratones KO presentan una disminuida capacidad de diferenciación a adipocitos en presencia de *pioglitazona* (agonista de PPAR $\gamma$ ) y que en una sección del hueso el contenido de adipocitos es menor que el de los ratones control, lo que parece indicar que Sam68 regula positivamente la diferenciación de las células mesenquimales de la médula ósea a adipocitos y regula negativamente la diferenciación a osteoblastos siendo este proceso el que puede estar detrás de la pérdida de masa ósea con el envejecimiento [183].

En otro trabajo con estos mismos ratones, se ha visto que la adipogénesis disminuida por la ausencia de Sam68 se debe a un defecto en la regulación del splicing alternativo de mTOR lo que conduce a un transcrito inestable por contener un codón STOP prematuro [181].

Por otro lado, la inhibición de mTor mediante rapamicina se ha visto que reprime la diferenciación en adipocitos 3T3-L1 por bloqueo de la expansión clonal en las primeras etapas del proceso [218] y también a lo largo del mismo por afectación de la vía de señalización de la insulina [219]. Recientemente se ha publicado otro estudio muy relacionado con lo anterior, que demuestra que la endostatina también inhibe la adipogénesis a través de mTor; más concretamente el estudio nos desvela cómo esta interacciona con Sam68 afecta negativamente la regulación del splicing alternativo del intrón 5 de mTor [220].

Otro estudio de ese mismo año publica resultados con el gen S6K1, y cómo la depleción de Sam68 también afecta al splicing alternativo de este gen provocando defectos en adipogénesis [214,214].

En cuanto a las etapas finales de la diferenciación, el tratamiento con rapamicina en células 3T3 no parece afectar significativamente los niveles de proteína de C/EBP- $\beta$  y  $\delta$  pero sí los de PPAR- $\gamma$  y C/EBP $\alpha$ . Además, el bloqueo con rapamicina inhibe la expresión de otros marcadores adipogénicos como adiposina y p21CIP que son objetivos de PPAR- $\gamma$  [191].

Viendo todos estos estudios donde se informa de la importancia del splicing-alternativo en la diferenciación del adipocito se comenta que existen muchos genes que participan en la dicha diferenciación y presentan diferentes isoformas mediante splicing alternativo, así PPAR $\gamma$  da lugar a dos variantes PPAR $\gamma$ 1 y 2 [221], Pref-1 factor del preadipocito da lugar a 5 variantes [222] y lipin presenta dos isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  [223].

Además merece mención un estudio del año pasado que recoge que la inhibición de Sam68 provoca, junto con una reducida capacidad adipogénica y un menor peso corporal en los ratones estudiados, una disminución de los depósitos de tejido adiposo blanco, y un incremento en la cantidad de tejido adiposo marrón [224], que demuestra una vez más el papel que parece desempeñar Sam68 en la homeostasis energética del organismo.

Con estos antecedentes y dado que Sam68 participa en el control del ciclo celular, en la regulación del splicing alternativo y en la vía de señalización de la insulina, nuestra hipótesis de partida era que Sam68 debía tener un papel importante tanto al inicio de la diferenciación como a lo largo de todo el proceso y que como resultado debían verse afectados los niveles de expresión de los factores de diferenciación que afectan a todas estas etapas. El interés añadido de esta Tesis es que por primera vez se describe cómo se ven afectados los niveles de Sam68, (hasta la fecha solo se conocían resultados de cómo afecta la ausencia de Sam68 a la diferenciación). Además, hemos demostrado mediante sobreexpresión ectópica de Sam68 que efectivamente esta proteína actúa desde el principio hasta el final de la diferenciación afectando a los niveles de expresión del resto de los marcadores adipogénicos lo que se traduce en una mayor y más efectiva diferenciación del adipocito; mientras que su inhibición produce exactamente lo contrario.

## **1. EXPRESIÓN DE SAM68 EN EL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN DE LOS ADIPOCITOS.**

Los resultados muestran un nivel alto de Sam68 2 días antes de la adición del estímulo de diferenciación quedando patente una disminución progresiva de Sam68 en las primeras fases de la misma; a partir de entonces encontramos una dinámica creciente de las cantidades de Sam68 aumentando hasta alcanzar el máximo en los últimos días.

Los primeros eventos de la diferenciación del adipocito, como son la parada del crecimiento por confluencia y la expansión clonal, vienen acompañados por complejos cambios en el patrón de la expresión de genes. Dos días después de alcanzar la confluencia es cuando se añade al cultivo de 3T3-L1 el estímulo de diferenciación, es entonces cuando los preadipocitos de forma sincronizada entran en expansión clonal mitótica. Los adipocitos pasan el punto de control de la transición G1/S y C/EBP- $\beta$  (que comienza a activarse de 2 a 4 horas después de la adición del estímulo) adquiere la capacidad de unirse al ADN y de promover la transcripción de genes adipogénicos que producen el fenotipo final del adipocito [51].

Por todo esto en el caso de Sam68 nos encontramos con unos niveles altos en la condición de preadipocito (día -2) que irán disminuyendo a lo largo de las 2 siguientes condiciones (hasta el día +2, mínimo alcanzado en todo el proceso). Esta expresión disminuida de sam68 al alcanzar la confluencia con respecto a la fase de crecimiento es consistente con el reconocido papel de Sam68 en la proliferación celular.

A partir del 2<sup>o</sup>-4<sup>o</sup> día de post-inducción de la diferenciación se activa la expresión de los principales marcadores tardíos (C/EBP $\alpha$  y PPAR- $\gamma$ ). Del mismo modo los niveles de Sam68 también comienzan a incrementarse a partir del 4<sup>o</sup> día post-diferenciación hasta llegar a niveles máximos hacia el final del proceso. Dado que Sam68 tiene importantes funciones en regulación postranscripcional y en señalización celular, sería lógico pensar que este incremento paralelo a C/EBP $\alpha$  y PPAR $\gamma$  sea necesario para que se produzca la consecuente estimulación de genes proadipogénicos que van a determinar la adquisición del fenotipo final del adipocito. Conforme se avanza en la diferenciación, encontramos un aumento en la expresión de receptores de insulina [225,226] y leptina

[227,228]; esto conlleva un aumento en la expresión y el número de proteínas de estas vías de señalización, siendo Sam68, como hemos dicho, participe en ambas [126,133]. El papel de Sam68 como mediador en la vía de señalización del receptor de la insulina explicaría el aumento en sus niveles. De hecho, nuestro grupo ha demostrado que la estimulación con insulina estimula la expresión de Sam68 en diferentes sistemas [154].

En cuanto a la regulación postranscripcional, como ya se ha dicho anteriormente, Sam68 tendría un papel en la regulación del splicing alternativo de mTOR. Ya que la vía PI3K/PKB/mTOR estimulada por la insulina en el proceso de diferenciación es una de las principales responsables de incrementar la expresión de C/EBP $\alpha$  y PPAR $\gamma$  se podría pensar que también lo fuera del incremento de la expresión de Sam68. Desde este punto de vista, si el aumento en la expresión de Sam68 está regulado por la vía de mTOR, estaríamos hablando de una autorregulación positiva de Sam68 en el proceso de diferenciación desde las primeras etapas hasta las últimas. Sin embargo, la comprobación de este hecho requerirá experimentos adicionales.

## **2. FOSFORILACIÓN EN TIROSINA DE SAM68 DURANTE LA ADIPOGENESIS**

Como ya hemos comentado en este trabajo Sam68 es una proteína STAR, con capacidad de unión a ARN que además contiene una secuencia NLS o señal de localización nuclear en su extremo carboxi-terminal, por lo que en la mayoría de casos presenta unas funciones predominantemente localizadas en el núcleo celular.

Nuestro grupo ha podido confirmar cómo Sam68 también participa como molécula adaptadora en vías de señalización o en la respuesta a la activación de los receptores de membrana tales como el receptor de insulina o de leptina; incluso un estudio se ha declinado por la posibilidad de que este tipo de proteínas (proteínas de unión a ARN, como Sam68) sea un punto de convergencia de las vías de señalización de PI3K y p38MAPK [229]; por lo que en determinadas situaciones y tejidos se puede encontrar a Sam68 ejerciendo funciones citoplasmáticas.

Con respecto a la fosforilación en tirosina de Sam68 existen numerosos estudios que demuestran que dicha fosforilación provoca una pérdida en su capacidad de unión a ARN [153], mientras que, por otro lado, también presenta una aptencia por dominios SH2 como los de la familia de quinasas Src, RasGAP o Itk/Tec. Además, nuestro grupo de investigación ya presentó un estudio donde se demostraba que una activación de la vía de la leptina provoca un aumento tanto en la tirosín fosforilación de Sam68 como en su expresión [160]. En el caso de la vía de señalización de la insulina se evidenció también cómo Sam68 aumenta su expresión cuando la célula es estimulada por insulina y es fosforilada y reclutada como molécula adaptadora de dicha vía [154,230]. Por todo lo anterior, nos inclinamos a realizar en esta tesis la medición de los niveles de fosforilación en tirosina de Sam68, ya que durante el proceso de la diferenciación del adipocito existe un aumento tanto en el número de receptores de leptina como de insulina [216-219].

Los resultados muestran que la fosforilación se mantiene baja durante las 3 primeras condiciones. Estas primeras fases tienen en común procesos de ciclo celular (mitosis, expansión clonal, etc.) donde Sam68 parece tener un papel fundamental en la transición de la fase G1 al S del ciclo celular [149].

Por el contrario, a partir del segundo día post-inducción de la diferenciación es cuando se observan cómo los niveles de tirosín fosforilación de Sam68 empiezan a aumentar progresivamente hasta alcanzar el máximo nivel en la última condición de nuestro experimento. Viendo estos resultados nos refuerza la idea que Sam68 podría estar implicado como molécula adaptadora de las vías de señalización tanto de la insulina como de la leptina ya que, como hemos comentado, tanto la expresión de los receptores como la activación de ambas vías metabólicas en la diferenciación del adipocito se producen de manera paralela a los resultados de fosforilación observados en esta tesis, con valores crecientes en las últimas etapas de la diferenciación del adipocito.

### **3. EFECTOS DE LA SOBREEXPRESIÓN E INHIBICIÓN DE SAM68 EN LA DIFERENCIACIÓN DE LOS ADIPOCITOS.**

#### **- SAM68**

Con respecto a la sobreexpresión vemos que la transfección de células 3T3-L1 un día antes de la adición del estímulo de diferenciación condujo a la expresión de niveles máximos y constantes de Sam68 a lo largo de todo el proceso de diferenciación a partir del día cero. Estos valores estaban por encima de los valores normales de expresión. El objetivo de este experimento era determinar si el patrón normal de expresión de los principales factores de diferenciación era dependiente de la alteración de los niveles normales de expresión de Sam68.

Con la inhibición se encontró que, aunque se observa que tuvo éxito apenas 24 horas después de la transfección, las mayores diferencias se encuentran en las últimas condiciones. Por esto, se esperaba que C/EBP $\beta$  y  $\delta$ , mucho más activos en los primeros días de diferenciación, se vieran menos afectados por la inhibición de Sam68. Sin embargo esto no se cumplió perfectamente, tal y como se comenta a continuación.

#### **- C/EBP $\beta$**

Es uno de los factores de transcripción más estudiados de la diferenciación del adipocito. Comienza a tener importancia en las primeras fases del proceso y se cree que controla, junto a la forma  $\delta$ , la expresión de numerosos genes proadipogénicos, también la de los otros factores de transcripción más importante en las etapas finales, que son C/EBP $\alpha$  y PPAR $\gamma$ .

Nuestros resultados sobre la expresión de C/EBP $\beta$  cuando se sobreexpresa Sam68 indican que este marcador de diferenciación es sensible a los niveles de Sam68. Así, los mayores niveles de C/EBP $\beta$  se presentan a día cero, siendo dos veces superiores a los niveles en condiciones de expresión normal de Sam68. Este dato es aún más interesante si tenemos en cuenta que el incremento en los niveles de C/EBP $\beta$  es independiente del estímulo de diferenciación, puesto que las muestras celulares fueron tomadas antes de la adición. Como posible

continuación de esta Tesis, sería interesante determinar si la sobreexpresión de Sam68 conduce a la diferenciación de las 3T3-L1 sin adición del estímulo de diferenciación puesto que se ha visto que la sobreexpresión ectópica de C/EBP $\beta$  es suficiente para inducir la diferenciación de estas células sin la adición de inductores hormonales [59].

Observando los valores de dicho C/EBP $\beta$  cuando se inhibe Sam68 encontramos una gran disminución de los niveles en las primeras condiciones después de la inducción de la diferenciación. Existen numerosos estudios que demuestran cómo una disminución o inhibición de C/EBP $\beta$  provoca un descenso, aunque débil, en la capacidad de diferenciación en la línea celular 3T3-L1, a través de la vía de señalización Wnt o mTor [181], tanto “in vitro” como “in vivo” [60].

Volviendo a los resultados de sobreexpresión, donde no existe bibliografía al respecto, dicho aumento de la expresión de C/EBP $\beta$  conduce a un aumento de la capacidad de diferenciación, tal y como se refleja en los resultados de acumulación lipídica. De nuevo, podríamos especular que el efecto de Sam68 sobre la expresión de C/EBP $\beta$  esté mediado por mTOR, reforzándose la idea de considerar a Sam68 como uno de los primeros y más importante orquestadores de la diferenciación del adipocito. Según esto, en las 3T3-L1 el efecto de Sam68 sobre mTOR podría ser a través de 3 mecanismos, el 1º implicaría el aumento de los niveles de mTOR por regulación positiva de su splicing alternativo, el 2º implicaría el aumento en los niveles de expresión de IR que conducirían a una mayor actividad de la vía PI3K/PKB/mTOR en condiciones basales y el 3º implicaría a la propia Sam68 como proteína mediadora de la vía de señalización de insulina que conduce a la activación de mTOR. Sin embargo, cualquiera de estas posibilidades tanto de forma conjunta como aislada deberá ser comprobada con experimentos adicionales. Resultados no publicados de nuestro grupo, muestran que la sobreexpresión de Sam68 en células CHO (células de ovario de hámster chino) incrementan la sobreexpresión de IR lo que se traduce en una mayor estimulación basal de la vía en ausencia de insulina. Además, recientemente, nuestro grupo ha publicado que la inhibición de la expresión de Sam68 en células de cáncer de mama inhibe la expresión de IRS-1, lo que toda la vía de señalización del receptor de insulina podría mediar estos efectos de Sam68 [208].

### - *C/EBP $\delta$*

Es el otro factor de transcripción que precipita todo el mecanismo de acción en las primeras etapas de la diferenciación. Se encuentran similitudes con su homónimo  $\beta$ , ya que participa en la transcripción de numerosas proteínas proadipogénicas como PPAR $\gamma$  [231]. Sin embargo hay estudios que muestran cómo una disminuida capacidad de diferenciación no conlleva una rebaja en los niveles de C/EBP $\delta$  [181].

Con respecto a los resultados obtenidos en esta Tesis doctoral descubrimos un aumento en los niveles de expresión de C/EBP $\delta$  cuando se sobreexpresa Sam68, encontrando niveles mucho más altos en las etapas finales. Al contrario de lo visto en el apartado anterior para C/EBP $\beta$ , aquí observamos un cambio en el patrón de los niveles a lo largo del proceso con respecto al control; siendo las últimas condiciones las que presentan valores más altos. Sin embargo, la afectación de los niveles de expresión de C/EBP $\delta$  también fue independiente de la adición del estímulo de diferenciación.

C/EBP $\delta$  a diferencia de lo que ocurre con C/EBP $\beta$  sí depende de la adición de agentes inductores de la diferenciación para inducir adipogénesis, [59] sin embargo el incremento de expresión de C/EBP $\delta$  que se ve a día cero en los experimentos de sobreexpresión de Sam68 es alrededor de dos veces mayor que el de las células control, un incremento muy similar al visto para C/EBP $\beta$ . El hecho de que la sobreexpresión de Sam68 induzca la máxima expresión de C/EBP $\delta$  hacia los últimos días de la diferenciación es algo que no ocurre con C/EBP $\beta$  y podría deberse a un efecto indirecto desconocido de la sobreexpresión de Sam68. Recientemente se han descrito otros papeles para C/EBP $\delta$  en tipos celulares diferentes del adipocito, donde se ha visto que actúa como supresor de tumores, jugando un papel importante en las vías de reparación del ADN [38], y en la inflamación donde sus niveles de ARNm aumentan tras la estimulación con estímulos inflamatorios [232]. En nuestro caso, tan sólo hemos medido niveles de factores relacionados con la diferenciación pero no sabemos que otras proteínas pueden haber sido afectadas por la sobreexpresión de Sam68. El incremento tardío de la expresión de C/EBP $\delta$  puede ser una consecuencia indirecta de una sobreexpresión o sobrestimulación de las vías inflamatorias como la de NF-kB, hipótesis que deberá ser comprobada en futuros trabajos.

La inhibición de Sam68 provoca una disminución también en los niveles de C/EBP $\delta$ , sobre todo en la última parte de la diferenciación. Algunos estudios nos hablan de los diferentes medios a través de los cuales una disminución como la que nosotros encontramos de C/EBP $\delta$  es capaz de provocar un efecto antiadipogénico, encontrando variaciones en la vía de señalización de AMPK (proteína quinasa activada por AMP cíclico) [233] o incluso a través de la vía de Wnt/ $\beta$ -catenina [234].

### - *C/EBP $\alpha$*

Es uno de los factores de transcripción más estudiados en la diferenciación de la línea celular 3T3-L1, como ya se vio anteriormente. Lleva a cabo la activación de la mayoría de los genes proadipogénicos de las últimas etapas de la diferenciación del adipocito. De hecho junto con PPAR $\gamma$  y C/EBP $\beta$  son los únicos factores de transcripción que cuando se sobreexpresan en preadipocitos 3T3-L1 inducen adipogénesis en ausencia de inducción hormonal [65-67]. Existen numerosos estudios que muestran la correlación entre el grado de adipogénesis en 3T3-L1 y la expresión de C/EBP $\alpha$ , por lo que un aumento de C/EBP $\alpha$  conduciría a un aumento en la capacidad de adipogénesis y viceversa [235]. En nuestro caso se observa un aumento importante en los niveles de C/EBP $\alpha$  cuando se sobreexpresa Sam68, por lo que resulta interesante pensar que, como en los anteriores datos obtenidos hasta ahora con los demás factores de transcripción estudiados, la sobreexpresión de Sam68 llevaría a un aumento en la capacidad de adipogénesis murina mientras que la inhibición conduce a lo contrario.

### - *PPAR $\gamma$*

Para terminar con los datos obtenidos con respecto a los factores de transcripción más importantes de la diferenciación, cuando sobreexpresamos Sam68, encontramos que PPAR $\gamma$  presenta datos similares a los casos anteriores. Existe literatura que en este caso también relaciona capacidad adipogénica con niveles de PPAR $\gamma$  [191,236].

Con respecto a la inhibición, ya mencionamos anteriormente, que hay un estudio que muestra una reducción en la capacidad adipogénica cuando se inhibe Sam68, y que esto se realiza a través de la vía mTor, donde Sam68 parece participar de forma esencial en el control post-transcripcional de este gen que participa principalmente en la síntesis de proteínas [181]. Con esto deducimos las mismas ideas que en el caso anterior con C/EBP $\alpha$ , relacionando un aumento de cantidad de proteínas con una mayor capacidad de diferenciación adipogénica y viceversa.

### **En resumen:**

La sobreexpresión de Sam68 provoca un aumento en los niveles de los factores de transcripción estudiados y en todas las condiciones sin variar, en general, el patrón o dinámica encontrada en los controles. El aumento de Sam68 en el proceso de diferenciación, sobre todo en las etapas finales, podría hacer pensar que Sam68 tendría un importante papel como proteína acopladora en las vías de señalización implicadas en el proceso, como la vía de la insulina y de la leptina. Respecto a la inhibición se comprobó que ocurre justo lo contrario, y es explicado con el estudio mencionado en el apartado anterior [181], donde relacionan la adipogénesis con la función de Sam68 como proteína reguladora del corte-empalme alternativo del gen mTor. Además, nuestros resultados de fosforilación, de morfología y de acumulación de triglicéridos, concuerdan con la idea que Sam68 podría modular el proceso y nos abre la puerta de la posible importancia que podría tener esta proteína en el intento de controlar el metabolismo del adipocito.



# CONCLUSIONES



## VI. CONCLUSIONES

Una vez expuesta la parte experimental de este trabajo y discutidos los resultados del mismo, concluimos los siguientes puntos:

**1. – La expresión de Sam68 disminuye al detenerse el crecimiento de las células 3T3-L1, y se incrementa progresivamente a lo largo de la diferenciación de los adipocitos. La fosforilación en tirosina de Sam68 en la diferenciación indica que puede estar mediando transducción de señales, como la del receptor de insulina.**

**2. - Sam68 tiene un efecto pro-diferenciador de la diferenciación potenciando la acción de los agentes estimuladores (insulina, dexametasona e IBMX). Este efecto es precoz, ya que la sobreexpresión de Sam68 antes de iniciar la diferenciación potencia la expresión de los factores reguladores de la adipogénesis, tanto tempranos, C/EBP-beta y delta, como tardíos, C/EBP-alfa y PPAR-gamma.**

**3. – Sam68 es necesario para el desarrollo de la diferenciación normal de los preadipocitos, ya que la inhibición de su expresión impide dicha diferenciación.**

**4. – La sobreexpresión de Sam68 durante la diferenciación del adipocito provoca una mayor capacidad adipogénica tanto morfológica como metabólicamente en las células 3T3-L1.**

**5. – La inhibición de Sam68 provoca una disminución en los niveles de PPAR- $\gamma$ , CEBP- $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$ .**

**6. – La inhibición de Sam68 durante la diferenciación del adipocito provoca una menor capacidad adipogénica tanto morfológica como metabólicamente en las células 3T3-L1.**



# BIBLIOGRAFÍA



## VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppack SW: C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:972-978, 1999.
2. Engstrom G, Hedblad B, Stavenow L, Lind P, Janzon L, Lindgarde F: Inflammation-sensitive plasma proteins are associated with future weight gain. *Diabetes* 52:2097-2101, 2003.
3. Trayhurn P, Wood IS: Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 92:347-355, 2004.
4. Rajala MW, Scherer PE: Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology* 144:3765-3773, 2003.
5. Hotamisligil GS: Inflammatory pathways and insulin action. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27 Suppl 3:S53-5.:S53-S55, 2003.
6. Yudkin JS: Adipose tissue, insulin action and vascular disease: inflammatory signals. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27 Suppl 3:S25-8.:S25-S28, 2003.
7. Esposito K, Pontillo A, Giugliano F, Giugliano G, Marfella R, Nicoletti G, Giugliano D: Association of low interleukin-10 levels with the metabolic syndrome in obese women. *J Clin Endocrinol Metab* 88:1055-1058, 2003.
8. Esposito K, Pontillo A, Ciotola M, Di PC, Grella E, Nicoletti G, Giugliano D: Weight loss reduces interleukin-18 levels in obese women. *J Clin Endocrinol Metab* 87:3864-3866, 2002.
9. Feldman BJ, Streeper RS, Farese RV, Jr., Yamamoto KR: Myostatin modulates adipogenesis to generate adipocytes with favorable metabolic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:15675-15680, 2006.
10. McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ: Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 387:83-90, 1997.
11. Poissonnet CM, Burdi AR, Garn SM: The chronology of adipose tissue appearance and distribution in the human fetus. *Early Hum Dev* 10:1-11, 1984.
12. Entingh AJ, Taniguchi CM, Kahn CR: Bi-directional regulation of brown fat adipogenesis by the insulin receptor. *J Biol Chem* 278:33377-33383, 2003.

13. Farmer SR: Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab* 4:263-273, 2006.
14. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, Wang S, Fortier M, Greenberg AS, Obin MS: Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res* 46:2347-2355, 2005.
15. Bakker AH, Van Dielen FM, Greve JW, Adam JA, Buurman WA: Preadipocyte number in omental and subcutaneous adipose tissue of obese individuals. *Obes Res* 12:488-498, 2004.
16. Ronti T, Lupattelli G, Mannarino E: The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol (Oxf)* 64:355-365, 2006.
17. Sanchez-Lasheras C, Konner AC, Bruning JC: Integrative neurobiology of energy homeostasis-neurocircuits, signals and mediators. *Front Neuroendocrinol* 31:4-15, 2010.
18. Moro C, Crampes F, Sengenès C, De G, I, Galitzky J, Thalamas C, Lafontan M, Berlan M: Atrial natriuretic peptide contributes to physiological control of lipid mobilization in humans. *FASEB J* 18:908-910, 2004.
19. Schaffler A, Scholmerich J, Buechler C: The role of 'adipotropins' and the clinical importance of a potential hypothalamic-pituitary-adipose axis. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2:374-383, 2006.
20. Ling C, Svensson L, Oden B, Weijdegård B, Eden B, Eden S, Billig H: Identification of functional prolactin (PRL) receptor gene expression: PRL inhibits lipoprotein lipase activity in human white adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 88:1804-1808, 2003.
21. de Lloyd A., Bursell J, Gregory JW, Rees DA, Ludgate M: TSH receptor activation and body composition. *J Endocrinol* 204:13-20, 2010.
22. Cho KJ, Shim JH, Cho MC, Choe YK, Hong JT, Moon DC, Kim JW, Yoon DY: Signaling pathways implicated in alpha-melanocyte stimulating hormone-induced lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *J Cell Biochem* 96:869-878, 2005.
23. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432, 1994.
24. Friedman JM, Halaas JL: Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395:763-770, 1998.
25. Perez-Perez A, Sanchez-Jimenez F, Maymo J, Duenas JL, Varone C, Sanchez-Margalet V: Role of leptin in female reproduction. *Clin Chem Lab Med* 2014.

26. Bouloumie A, Drexler HC, Lafontan M, Busse R: Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. *Circ Res* 83:1059-1066, 1998.
27. Gainsford T, Willson TA, Metcalf D, Handman E, McFarlane C, Ng A, Nicola NA, Alexander WS, Hilton DJ: Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:14564-14568, 1996.
28. Loffreda S, Yang SQ, Lin HZ, Karp CL, Brengman ML, Wang DJ, Klein AS, Bulkley GB, Bao C, Noble PW, Lane MD, Diehl AM: Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J* 12:57-65, 1998.
29. Martin-Romero C, Santos-Alvarez J, Goberna R, Sanchez-Margalet V: Human leptin enhances activation and proliferation of human circulating T lymphocytes. *Cell Immunol* 199:15-24, 2000.
30. Martin-Romero C, Sanchez-Margalet V: Human leptin activates PI3K and MAPK pathways in human peripheral blood mononuclear cells: possible role of Sam68. *Cell Immunol* 212:83-91, 2001.
31. Martin-Romero C, Sanchez-Margalet V: Human leptin activates PI3K and MAPK pathways in human peripheral blood mononuclear cells: possible role of Sam68. *Cell Immunol* 212:83-91, 2001.
32. Martin-Gonzalez J, Sanchez-Jimenez F, Perez-Perez A, Carmona-Fernandez A, Sanchez-Margalet V, Segura-Egea JJ: Leptin expression in healthy and inflamed human dental pulp. *Int Endod J* 46:442-448, 2013.
33. Stepan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA: The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409:307-312, 2001.
34. Reginato MJ, Lazar MA: Mechanisms by which Thiazolidinediones Enhance Insulin Action. *Trends Endocrinol Metab* 10:9-13, 1999.
35. Kozuch O, Mayer V: Pig kidney epithelial (PS) cells: a perfect tool for the study of flaviviruses and some other arboviruses. *Acta Virol* 19:498, 1975.
36. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T: The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipotrophy and obesity. *Nat Med* 7:941-946, 2001.
37. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T: Adiponectin stimulates

- glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 8:1288-1295, 2002.
38. Wang J, Sarkar TR, Zhou M, Sharan S, Ritt DA, Veenstra TD, Morrison DK, Huang AM, Sterneck E: CCAAT/enhancer binding protein delta (C/EBPdelta, CEBPD)-mediated nuclear import of FANCD2 by IPO4 augments cellular response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:16131-16136, 2010.
  39. Lemberger T, Desvergne B, Wahli W: Peroxisome proliferator-activated receptors: a nuclear receptor signaling pathway in lipid physiology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:335-63.:335-363, 1996.
  40. Fajas L, Fruchart JC, Auwerx J: Transcriptional control of adipogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 10:165-173, 1998.
  41. Umek RM, Friedman AD, McKnight SL: CCAAT-enhancer binding protein: a component of a differentiation switch. *Science* 251:288-292, 1991.
  42. Hu E, Tontonoz P, Spiegelman BM: Transdifferentiation of myoblasts by the adipogenic transcription factors PPAR gamma and C/EBP alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9856-9860, 1995.
  43. Ntambi JM, Young-Cheul K: Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr* 130:3122S-3126S, 2000.
  44. Pairault J, Green H: A study of the adipose conversion of suspended 3T3 cells by using glycerophosphate dehydrogenase as differentiation marker. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:5138-5142, 1979.
  45. MacDougald OA, Lane MD: Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu Rev Biochem* 64:345-73.:345-373, 1995.
  46. Umek RM, Friedman AD, McKnight SL: CCAAT-enhancer binding protein: a component of a differentiation switch. *Science* 251:288-292, 1991.
  47. Niehof M, Manns MP, Trautwein C: CREB controls LAP/C/EBP beta transcription. *Mol Cell Biol* 17:3600-3613, 1997.
  48. Zhang JW, Klemm DJ, Vinson C, Lane MD: Role of CREB in transcriptional regulation of CCAAT/enhancer-binding protein beta gene during adipogenesis. *J Biol Chem* 279:4471-4478, 2004.
  49. Zhang JW, Tang QQ, Vinson C, Lane MD: Dominant-negative C/EBP disrupts mitotic clonal expansion and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:43-47, 2004.

50. Tang QQ, Lane MD: Activation and centromeric localization of CCAAT/enhancer-binding proteins during the mitotic clonal expansion of adipocyte differentiation. *Genes Dev* 13:2231-2241, 1999.
51. Tang QQ, Otto TC, Lane MD: CCAAT/enhancer-binding protein beta is required for mitotic clonal expansion during adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:850-855, 2003.
52. Davis LA, Zur Nieden NI: Mesodermal fate decisions of a stem cell: the Wnt switch. *Cell Mol Life Sci* 65:2658-2674, 2008.
53. Student AK, Hsu RY, Lane MD: Induction of fatty acid synthetase synthesis in differentiating 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem* 255:4745-4750, 1980.
54. Spiegelman BM, Frank M, Green H: Molecular cloning of mRNA from 3T3 adipocytes. Regulation of mRNA content for glycerophosphate dehydrogenase and other differentiation-dependent proteins during adipocyte development. *J Biol Chem* 258:10083-10089, 1983.
55. Garcia de HA, Birnbaum MJ: The acquisition of increased insulin-responsive hexose transport in 3T3-L1 adipocytes correlates with expression of a novel transporter gene. *J Biol Chem* 264:19994-19999, 1989.
56. Feve B, Emorine LJ, Briend-Sutren MM, Lasnier F, Strosberg AD, Pairault J: Differential regulation of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor protein and mRNA levels by glucocorticoids during 3T3-F442A adipose differentiation. *J Biol Chem* 265:16343-16349, 1990.
57. Tang QQ, Lane MD: Activation and centromeric localization of CCAAT/enhancer-binding proteins during the mitotic clonal expansion of adipocyte differentiation. *Genes Dev* 13:2231-2241, 1999.
58. Cao Z, Umek RM, McKnight SL: Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev* 5:1538-1552, 1991.
59. Yeh WC, Cao Z, Classon M, McKnight SL: Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes Dev* 9:168-181, 1995.
60. Tanaka T, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S: Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene. *EMBO J* 16:7432-7443, 1997.
61. Tang QQ, Gronborg M, Huang H, Kim JW, Otto TC, Pandey A, Lane MD: Sequential phosphorylation of CCAAT enhancer-binding protein beta by MAPK and glycogen synthase kinase 3beta is required for adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:9766-9771, 2005.

62. Morrison RF, Farmer SR: Role of PPARgamma in regulating a cascade expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, p18(INK4c) and p21(Waf1/Cip1), during adipogenesis. *J Biol Chem* 274:17088-17097, 1999.
63. Tang QQ, Otto TC, Lane MD: Mitotic clonal expansion: a synchronous process required for adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:44-49, 2003.
64. Hishida T, Nishizuka M, Osada S, Imagawa M: The role of C/EBPdelta in the early stages of adipogenesis. *Biochimie* 91:654-657, 2009.
65. Freytag SO, Geddes TJ: Reciprocal regulation of adipogenesis by Myc and C/EBP alpha. *Science* 256:379-382, 1992.
66. Freytag SO, Paielli DL, Gilbert JD: Ectopic expression of the CCAAT/enhancer-binding protein alpha promotes the adipogenic program in a variety of mouse fibroblastic cells. *Genes Dev* 8:1654-1663, 1994.
67. Lin FT, Lane MD: CCAAT/enhancer binding protein alpha is sufficient to initiate the 3T3-L1 adipocyte differentiation program. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:8757-8761, 1994.
68. Lane MD, Tang QQ, Jiang MS: Role of the CCAAT enhancer binding proteins (C/EBPs) in adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 266:677-683, 1999.
69. Christy RJ, Kaestner KH, Geiman DE, Lane MD: CCAAT/enhancer binding protein gene promoter: binding of nuclear factors during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:2593-2597, 1991.
70. Abboud TK, Zhu J, Richardson M, Peres da SE, Donovan M: Desflurane: a new volatile anesthetic for cesarean section. Maternal and neonatal effects. *Acta Anaesthesiol Scand* 39:723-726, 1995.
71. Clarke SL, Robinson CE, Gimble JM: CAAT/enhancer binding proteins directly modulate transcription from the peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 240:99-103, 1997.
72. Date T, Doiguchi Y, Nobuta M, Shindo H: Bone morphogenetic protein-2 induces differentiation of multipotent C3H10T1/2 cells into osteoblasts, chondrocytes, and adipocytes in vivo and in vitro. *J Orthop Sci* 9:503-508, 2004.
73. Schwarz EJ, Reginato MJ, Shao D, Krakow SL, Lazar MA: Retinoic acid blocks adipogenesis by inhibiting C/EBPbeta-mediated transcription. *Mol Cell Biol* 17:1552-1561, 1997.

74. Elberg G, Gimble JM, Tsai SY: Modulation of the murine peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 promoter activity by CCAAT/enhancer-binding proteins. *J Biol Chem* 275:27815-27822, 2000.
75. Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, McKeon C, Darlington GJ, Spiegelman BM: Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell* 3:151-158, 1999.
76. Tontonoz P, Spiegelman BM: Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu Rev Biochem* 77:289-312. doi: 10.1146/annurev.biochem.77.061307.091829.:289-312, 2008.
77. Green S, Wahli W: Peroxisome proliferator-activated receptors: finding the orphan a home. *Mol Cell Endocrinol* 100:149-153, 1994.
78. Fajas L, Fruchart JC, Auwerx J: PPARgamma3 mRNA: a distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett* 438:55-60, 1998.
79. Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JC, Deeb S, Vidal-Puig A, Flier J, Briggs MR, Staels B, Vidal H, Auwerx J: The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem* 272:18779-18789, 1997.
80. Lemberger T, Desvergne B, Wahli W: Peroxisome proliferator-activated receptors: a nuclear receptor signaling pathway in lipid physiology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:335-63.:335-363, 1996.
81. Hu E, Tontonoz P, Spiegelman BM: Transdifferentiation of myoblasts by the adipogenic transcription factors PPAR gamma and C/EBP alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9856-9860, 1995.
82. Egan JJ, Greenberg AS, Chang MK, Wek SA, Moos MC, Jr., Londos C: Mechanism of hormone-stimulated lipolysis in adipocytes: translocation of hormone-sensitive lipase to the lipid storage droplet. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:8537-8541, 1992.
83. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM: Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 79:1147-1156, 1994.
84. Ahrens M, Ankenbauer T, Schroder D, Hollnagel A, Mayer H, Gross G: Expression of human bone morphogenetic proteins-2 or -4 in murine mesenchymal progenitor C3H10T1/2 cells induces differentiation into distinct mesenchymal cell lineages. *DNA Cell Biol* 12:871-880, 1993.

85. Boss O, Hagen T, Lowell BB: Uncoupling proteins 2 and 3: potential regulators of mitochondrial energy metabolism. *Diabetes* 49:143-156, 2000.
86. Fleury C, Neverova M, Collins S, Raimbault S, Champigny O, Levi-Meyrueis C, Bouillaud F, Seldin MF, Surwit RS, Ricquier D, Warden CH: Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet* 15:269-272, 1997.
87. Brown MS, Goldstein JL: The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89:331-340, 1997.
88. Kim JB, Spiegelman BM: ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev* 10:1096-1107, 1996.
89. Ribot J, Rantala M, Kesaniemi YA, Palou A, Savolainen MJ: Weight loss reduces expression of SREBP1c/ADD1 and PPARgamma2 in adipose tissue of obese women. *Pflugers Arch* 441:498-505, 2001.
90. Vernet C, Artzt K: STAR, a gene family involved in signal transduction and activation of RNA. *Trends Genet* 13:479-484, 1997.
91. Itoh M, Haga I, Li QH, Fujisawa J: Identification of cellular mRNA targets for RNA-binding protein Sam68. *Nucleic Acids Res* 30:5452-5464, 2002.
92. Dreyfuss G, Matunis MJ, Pinol-Roma S, Burd CG: hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu Rev Biochem* 62:289-321, 1993.
93. Fumagalli S, Totty NF, Hsuan JJ, Courtneidge SA: A target for Src in mitosis. *Nature* 368:871-874, 1994.
94. Taylor SJ, Shalloway D: An RNA-binding protein associated with Src through its SH2 and SH3 domains in mitosis. *Nature* 368:867-871, 1994.
95. Burd CG, Dreyfuss G: Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science* 265:615-621, 1994.
96. Siomi H, Matunis MJ, Michael WM, Dreyfuss G: The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif. *Nucleic Acids Res* 21:1193-1198, 1993.
97. Lin Q, Taylor SJ, Shalloway D: Specificity and determinants of Sam68 RNA binding. Implications for the biological function of K homology domains. *J Biol Chem* 272:27274-27280, 1997.

98. Chen T, Damaj BB, Herrera C, Lasko P, Richard S: Self-association of the single-KH-domain family members Sam68, GRP33, GLD-1, and Qk1: role of the KH domain. *Mol Cell Biol* 17:5707-5718, 1997.
99. Gibson TJ, Rice PM, Thompson JD, Heringa J: KH domains within the FMR1 sequence suggest that fragile X syndrome stems from a defect in RNA metabolism. *Trends Biochem Sci* 18:331-333, 1993.
100. Siomi H, Choi M, Siomi MC, Nussbaum RL, Dreyfuss G: Essential role for KH domains in RNA binding: impaired RNA binding by a mutation in the KH domain of FMR1 that causes fragile X syndrome. *Cell* 77:33-39, 1994.
101. Lewis HA, Musunuru K, Jensen KB, Edo C, Chen H, Darnell RB, Burley SK: Sequence-specific RNA binding by a Nova KH domain: implications for paraneoplastic disease and the fragile X syndrome. *Cell* 100:323-332, 2000.
102. Musco G, Kharrat A, Stier G, Fraternali F, Gibson TJ, Nilges M, Pastore A: The solution structure of the first KH domain of FMR1, the protein responsible for the fragile X syndrome. *Nat Struct Biol* 4:712-716, 1997.
103. Grishin NV: KH domain: one motif, two folds. *Nucleic Acids Res* 29:638-643, 2001.
104. Wong G, Muller O, Clark R, Conroy L, Moran MF, Polakis P, McCormick F: Molecular cloning and nucleic acid binding properties of the GAP-associated tyrosine phosphoprotein p62. *Cell* 69:551-558, 1992.
105. Taylor SJ, Shalloway D: An RNA-binding protein associated with Src through its SH2 and SH3 domains in mitosis. *Nature* 368:867-871, 1994.
106. Chen T, Damaj BB, Herrera C, Lasko P, Richard S: Self-association of the single-KH-domain family members Sam68, GRP33, GLD-1, and Qk1: role of the KH domain. *Mol Cell Biol* 17:5707-5718, 1997.
107. Barlat I, Maurier F, Duchesne M, Guitard E, Tocque B, Schweighoffer F: A role for Sam68 in cell cycle progression antagonized by a spliced variant within the KH domain. *J Biol Chem* 272:3129-3132, 1997.
108. Tremblay GA, Richard S: mRNAs associated with the Sam68 RNA binding protein. *RNA Biol* 3:90-93, 2006.
109. Reddy TR, Xu W, Mau JK, Goodwin CD, Suhasini M, Tang H, Frimpong K, Rose DW, Wong-Staal F: Inhibition of HIV replication by dominant negative mutants of Sam68, a functional homolog of HIV-1 Rev. *Nat Med* 5:635-642, 1999.

110. Di FM, Chen T, Richard S: Characterization of Sam68-like mammalian proteins SLM-1 and SLM-2: SLM-1 is a Src substrate during mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2710-2715, 1999.
111. Richard S, Yu D, Blumer KJ, Hausladen D, Olszowy MW, Connelly PA, Shaw AS: Association of p62, a multifunctional SH2- and SH3-domain-binding protein, with src family tyrosine kinases, Grb2, and phospholipase C gamma-1. *Mol Cell Biol* 15:186-197, 1995.
112. Derry JJ, Richard S, Valderrama CH, Ye X, Vasioukhin V, Cochrane AW, Chen T, Tyner AL: Sik (BRK) phosphorylates Sam68 in the nucleus and negatively regulates its RNA binding ability. *Mol Cell Biol* 20:6114-6126, 2000.
113. Taylor SJ, Anafi M, Pawson T, Shalloway D: Functional interaction between c-Src and its mitotic target, Sam 68. *J Biol Chem* 270:10120-10124, 1995.
114. Maa MC, Leu TH, Trandel BJ, Chang JH, Parsons SJ: A protein that is highly related to GTPase-activating protein-associated p62 complexes with phospholipase C gamma. *Mol Cell Biol* 14:5466-5473, 1994.
115. Espejo A, Cote J, Bednarek A, Richard S, Bedford MT: A protein-domain microarray identifies novel protein-protein interactions. *Biochem J* 367:697-702, 2002.
116. Trub T, Frantz JD, Miyazaki M, Band H, Shoelson SE: The role of a lymphoid-restricted, Grb2-like SH3-SH2-SH3 protein in T cell receptor signaling. *J Biol Chem* 272:894-902, 1997.
117. Najib S, Sanchez-Margalet V: Sam68 associates with the SH3 domains of Grb2 recruiting GAP to the Grb2-SOS complex in insulin receptor signaling. *J Cell Biochem* 86:99-106, 2002.
118. Andreotti AH, Bunnell SC, Feng S, Berg LJ, Schreiber SL: Regulatory intramolecular association in a tyrosine kinase of the Tec family. *Nature* 385:93-97, 1997.
119. Bunnell SC, Henry PA, Kolluri R, Kirchhausen T, Rickles RJ, Berg LJ: Identification of Itk/Tsk Src homology 3 domain ligands. *J Biol Chem* 271:25646-25656, 1996.
120. Lazer G, Pe'er L, Schapira V, Richard S, Katzav S: The association of Sam68 with Vav1 contributes to tumorigenesis. *Cell Signal* 19:2479-2486, 2007.
121. Lawe DC, Hahn C, Wong AJ: The Nck SH2/SH3 adaptor protein is present in the nucleus and associates with the nuclear protein SAM68. *Oncogene* 14:223-231, 1997.

122. Bedford MT, Chan DC, Leder P: FBP WW domains and the Abl SH3 domain bind to a specific class of proline-rich ligands. *EMBO J* 16:2376-2383, 1997.
123. Bedford MT, Frankel A, Yaffe MB, Clarke S, Leder P, Richard S: Arginine methylation inhibits the binding of proline-rich ligands to Src homology 3, but not WW, domains. *J Biol Chem* 275:16030-16036, 2000.
124. Vogel LB, Fujita DJ: p70 phosphorylation and binding to p56lck is an early event in interleukin-2-induced onset of cell cycle progression in T-lymphocytes. *J Biol Chem* 270:2506-2511, 1995.
125. Lang V, Mege D, Semichon M, Gary-Gouy H, Bismuth G: A dual participation of ZAP-70 and scr protein tyrosine kinases is required for TCR-induced tyrosine phosphorylation of Sam68 in Jurkat T cells. *Eur J Immunol* 27:3360-3367, 1997.
126. Sanchez-Margalet V, Najib S: p68 Sam is a substrate of the insulin receptor and associates with the SH2 domains of p85 PI3K. *FEBS Lett* 455:307-310, 1999.
127. Pawson T, Gish GD, Nash P: SH2 domains, interaction modules and cellular wiring. *Trends Cell Biol* 11:504-511, 2001.
128. Andreotti AH, Bunnell SC, Feng S, Berg LJ, Schreiber SL: Regulatory intramolecular association in a tyrosine kinase of the Tec family. *Nature* 385:93-97, 1997.
129. Lawe DC, Hahn C, Wong AJ: The Nck SH2/SH3 adaptor protein is present in the nucleus and associates with the nuclear protein SAM68. *Oncogene* 14:223-231, 1997.
130. Sanchez-Margalet V, Martin-Romero C: Human leptin signaling in human peripheral blood mononuclear cells: activation of the JAK-STAT pathway. *Cell Immunol* 211:30-36, 2001.
131. Lukong KE, Larocque D, Tyner AL, Richard S: Tyrosine phosphorylation of sam68 by breast tumor kinase regulates intranuclear localization and cell cycle progression. *J Biol Chem* 280:38639-38647, 2005.
132. Ishidate T, Yoshihara S, Kawasaki Y, Roy BC, Toyoshima K, Akiyama T: Identification of a novel nuclear localization signal in Sam68. *FEBS Lett* 409:237-241, 1997.
133. Sanchez-Margalet V, Najib S: Sam68 is a docking protein linking GAP and PI3K in insulin receptor signaling. *Mol Cell Endocrinol* 183:113-121, 2001.
134. Paronetto MP, Zalfa F, Botti F, Geremia R, Bagni C, Sette C: The nuclear RNA-binding protein Sam68 translocates to the cytoplasm and associates with the polysomes in mouse spermatocytes. *Mol Biol Cell* 17:14-24, 2006.

135. Reddy TR, Xu W, Mau JK, Goodwin CD, Suhasini M, Tang H, Frimpong K, Rose DW, Wong-Staal F: Inhibition of HIV replication by dominant negative mutants of Sam68, a functional homolog of HIV-1 Rev. *Nat Med* 5:635-642, 1999.
136. Gary JD, Clarke S: RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 61:65-131.:65-131, 1998.
137. McBride AE, Silver PA: State of the arg: protein methylation at arginine comes of age. *Cell* 106:5-8, 2001.
138. Stallcup MR: Role of protein methylation in chromatin remodeling and transcriptional regulation. *Oncogene* 20:3014-3020, 2001.
139. Rho J, Choi S, Jung CR, Im DS: Arginine methylation of Sam68 and SLM proteins negatively regulates their poly(U) RNA binding activity. *Arch Biochem Biophys* 466:49-57, 2007.
140. Cote J, Boisvert FM, Boulanger MC, Bedford MT, Richard S: Sam68 RNA binding protein is an in vivo substrate for protein arginine N-methyltransferase 1. *Mol Biol Cell* 14:274-287, 2003.
141. Resnick RJ, Taylor SJ, Lin Q, Shalloway D: Phosphorylation of the Src substrate Sam68 by Cdc2 during mitosis. *Oncogene* 15:1247-1253, 1997.
142. Babic I, Jakymiw A, Fujita DJ: The RNA binding protein Sam68 is acetylated in tumor cell lines, and its acetylation correlates with enhanced RNA binding activity. *Oncogene* 23:3781-3789, 2004.
143. Babic I, Cherry E, Fujita DJ: SUMO modification of Sam68 enhances its ability to repress cyclin D1 expression and inhibits its ability to induce apoptosis. *Oncogene* 25:4955-4964, 2006.
144. Lukong KE, Richard S: Sam68, the KH domain-containing superSTAR. *Biochim Biophys Acta* 1653:73-86, 2003.
145. Lock P, Fumagalli S, Polakis P, McCormick F, Courtneidge SA: The human p62 cDNA encodes Sam68 and not the RasGAP-associated p62 protein. *Cell* 84:23-24, 1996.
146. Chackalaparampil I, Shalloway D: Altered phosphorylation and activation of pp60c-src during fibroblast mitosis. *Cell* 52:801-810, 1988.
147. Cooper JA, Gould KL, Cartwright CA, Hunter T: Tyr527 is phosphorylated in pp60c-src: implications for regulation. *Science* 231:1431-1434, 1986.

148. Pillay I, Nakano H, Sharma SV: Radicicol inhibits tyrosine phosphorylation of the mitotic Src substrate Sam68 and retards subsequent exit from mitosis of Src-transformed cells. *Cell Growth Differ* 7:1487-1499, 1996.
149. Barlat I, Maurier F, Duchesne M, Guitard E, Tocque B, Schweighoffer F: A role for Sam68 in cell cycle progression antagonized by a spliced variant within the KH domain. *J Biol Chem* 272:3129-3132, 1997.
150. Taylor SJ, Resnick RJ, Shalloway D: Sam68 exerts separable effects on cell cycle progression and apoptosis. *BMC Cell Biol* 5:5.:5, 2004.
151. Tran T, Hoffmann S, Wiesehan K, Jonas E, Luge C, Aladag A, Willbold D: Insights into human Lck SH3 domain binding specificity: different binding modes of artificial and native ligands. *Biochemistry* 44:15042-15052, 2005.
152. Huot ME, Brown CM, Lamarche-Vane N, Richard S: An adaptor role for cytoplasmic Sam68 in modulating Src activity during cell polarization. *Mol Cell Biol* 29:1933-1943, 2009.
153. Wang LL, Richard S, Shaw AS: P62 association with RNA is regulated by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 270:2010-2013, 1995.
154. Sanchez-Margalet V, Gonzalez-Yanes C, Najib S, Fernandez-Santos JM, Martin-Lacave I: The expression of Sam68, a protein involved in insulin signal transduction, is enhanced by insulin stimulation. *Cell Mol Life Sci* 60:751-758, 2003.
155. Sanchez-Margalet V, Goldfine ID, Truitt K, Imboden J, Sung CK: Role of p85 subunit of phosphatidylinositol-3-kinase as an adaptor molecule linking the insulin receptor to insulin receptor substrate 1. *Mol Endocrinol* 9:435-442, 1995.
156. Guitard E, Barlat I, Maurier F, Schweighoffer F, Tocque B: Sam68 is a Ras-GAP-associated protein in mitosis. *Biochem Biophys Res Commun* 245:562-566, 1998.
157. Perez-Perez A, Sanchez-Jimenez F, Vilarino-Garcia T, de la Cruz L, Virizuela JA, Sanchez-Margalet V: Sam68 Mediates the Activation of Insulin and Leptin Signalling in Breast Cancer Cells. *PLoS One* 11:e0158218, 2016.
158. Sanchez-Margalet V, Martin-Romero C, Santos-Alvarez J, Goberna R, Najib S, Gonzalez-Yanes C: Role of leptin as an immunomodulator of blood mononuclear cells: mechanisms of action. *Clin Exp Immunol* 133:11-19, 2003.
159. Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG: Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest* 98:1101-1106, 1996.

160. Sanchez-Jimenez F, Perez-Perez A, Gonzalez-Yanes C, Varone CL, Sanchez-Margalet V: Sam68 mediates leptin-stimulated growth by modulating leptin receptor signaling in human trophoblastic JEG-3 cells. *Hum Reprod* 26:2306-2315, 2011.
161. Jabado N, Pallier A, Le DF, Bernard F, Fischer A, Hivroz C: CD4 ligands inhibit the formation of multifunctional transduction complexes involved in T cell activation. *J Immunol* 158:94-103, 1997.
162. Jauliac S, Mazerolles F, Jabado N, Pallier A, Bernard F, Peake J, Fischer A, Hivroz C: Ligands of CD4 inhibit the association of phospholipase Cgamma1 with phosphoinositide 3 kinase in T cells: regulation of this association by the phosphoinositide 3 kinase activity. *Eur J Immunol* 28:3183-3191, 1998.
163. Fusaki N, Iwamatsu A, Iwashima M, Fujisawa J: Interaction between Sam68 and Src family tyrosine kinases, Fyn and Lck, in T cell receptor signaling. *J Biol Chem* 272:6214-6219, 1997.
164. Tomalka JA, de Jesus TJ, Ramakrishnan P: Sam68 is a regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell Mol Immunol* 14:107-117, 2017.
165. El MM, Diep QN, Benkirane K, Touyz RM, Schiffrin EL: SAM68: a downstream target of angiotensin II signaling in vascular smooth muscle cells in genetic hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286:H1954-H1962, 2004.
166. Coyle JH, Guzik BW, Bor YC, Jin L, Eisner-Smerage L, Taylor SJ, Rekosh D, Hammarskjold ML: Sam68 enhances the cytoplasmic utilization of intron-containing RNA and is functionally regulated by the nuclear kinase Sik/BRK. *Mol Cell Biol* 23:92-103, 2003.
167. Cheung N, Chan LC, Thompson A, Cleary ML, So CW: Protein arginine-methyltransferase-dependent oncogenesis. *Nat Cell Biol* 9:1208-1215, 2007.
168. Yang JP, Reddy TR, Truong KT, Suhasini M, Wong-Staal F: Functional interaction of Sam68 and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K. *Oncogene* 21:7187-7194, 2002.
169. Hong W, Resnick RJ, Rakowski C, Shalloway D, Taylor SJ, Blobel GA: Physical and functional interaction between the transcriptional cofactor CBP and the KH domain protein Sam68. *Mol Cancer Res* 1:48-55, 2002.
170. Rajan P, Gaughan L, Dalgliesh C, El-Sherif A, Robson CN, Leung HY, Elliott DJ: The RNA-binding and adaptor protein Sam68 modulates signal-dependent splicing and transcriptional activity of the androgen receptor. *J Pathol* 215:67-77, 2008.

171. Sanchez-Jimenez F, Sanchez-Margalet V: Role of Sam68 in post-transcriptional gene regulation. *Int J Mol Sci* 14:23402-23419, 2013.
172. Stoss O, Olbrich M, Hartmann AM, Konig H, Memmott J, Andreadis A, Stamm S: The STAR/GSG family protein rSLM-2 regulates the selection of alternative splice sites. *J Biol Chem* 276:8665-8673, 2001.
173. Denegri M, Chiodi I, Corioni M, Cobianchi F, Riva S, Biamonti G: Stress-induced nuclear bodies are sites of accumulation of pre-mRNA processing factors. *Mol Biol Cell* 12:3502-3514, 2001.
174. Nayler O, Stratling W, Bourquin JP, Stagljar I, Lindemann L, Jasper H, Hartmann AM, Fackelmayer FO, Ullrich A, Stamm S: SAF-B protein couples transcription and pre-mRNA splicing to SAR/MAR elements. *Nucleic Acids Res* 26:3542-3549, 1998.
175. Weighardt F, Cobianchi F, Cartegni L, Chiodi I, Villa A, Riva S, Biamonti G: A novel hnRNP protein (HAP/SAF-B) enters a subset of hnRNP complexes and relocates in nuclear granules in response to heat shock. *J Cell Sci* 112:1465-1476, 1999.
176. Li J, Hawkins IC, Harvey CD, Jennings JL, Link AJ, Patton JG: Regulation of alternative splicing by SRrp86 and its interacting proteins. *Mol Cell Biol* 23:7437-7447, 2003.
177. Matter N, Herrlich P, Konig H: Signal-dependent regulation of splicing via phosphorylation of Sam68. *Nature* 420:691-695, 2002.
178. Cheng C, Sharp PA: Regulation of CD44 alternative splicing by SRm160 and its potential role in tumor cell invasion. *Mol Cell Biol* 26:362-370, 2006.
179. Pedrotti S, Bielli P, Paronetto MP, Ciccocanti F, Fimia GM, Stamm S, Manley JL, Sette C: The splicing regulator Sam68 binds to a novel exonic splicing silencer and functions in SMN2 alternative splicing in spinal muscular atrophy. *EMBO J* 29:1235-1247, 2010.
180. Sellier C, Rau F, Liu Y, Tassone F, Hukema RK, Gattoni R, Schneider A, Richard S, Willemsen R, Elliott DJ, Hagerman PJ, Charlet-Berguerand N: Sam68 sequestration and partial loss of function are associated with splicing alterations in FXTAS patients. *EMBO J* 29:1248-1261, 2010.
181. Huot ME, Vogel G, Zabarauskas A, Ngo CT, Coulombe-Huntington J, Majewski J, Richard S: The Sam68 STAR RNA-binding protein regulates mTOR alternative splicing during adipogenesis. *Mol Cell* 46:187-199, 2012.
182. Lukong KE, Richard S: Motor coordination defects in mice deficient for the Sam68 RNA-binding protein. *Behav Brain Res* 189:357-363, 2008.

183. Richard S, Torabi N, Franco GV, Tremblay GA, Chen T, Vogel G, Morel M, Cleroux P, Forget-Richard A, Komarova S, Tremblay ML, Li W, Li A, Gao YJ, Henderson JE: Ablation of the Sam68 RNA binding protein protects mice from age-related bone loss. *PLoS Genet* 1:e74, 2005.
184. Meng L, Luo J, Li C, Kinsey WH: Role of Src homology 2 domain-mediated PTK signaling in mouse zygotic development. *Reproduction* 132:413-421, 2006.
185. McGinnis LK, Albertini DF, Kinsey WH: Localized activation of Src-family protein kinases in the mouse egg. *Dev Biol* 306:241-254, 2007.
186. Paronetto MP, Messina V, Bianchi E, Barchi M, Vogel G, Moretti C, Palombi F, Stefanini M, Geremia R, Richard S, Sette C: Sam68 regulates translation of target mRNAs in male germ cells, necessary for mouse spermatogenesis. *J Cell Biol* 185:235-249, 2009.
187. Eleftheriou F, Ahn JD, Takeda S, Starbuck M, Yang X, Liu X, Kondo H, Richards WG, Bannon TW, Noda M, Clement K, Vaisse C, Karsenty G: Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature* 434:514-520, 2005.
188. Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, Shen J, Vinson C, Rueger JM, Karsenty G: Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell* 100:197-207, 2000.
189. Haegebarth A, Heap D, Bie W, Derry JJ, Richard S, Tyner AL: The nuclear tyrosine kinase BRK/Sik phosphorylates and inhibits the RNA-binding activities of the Sam68-like mammalian proteins SLM-1 and SLM-2. *J Biol Chem* 279:54398-54404, 2004.
190. Huot ME, Vogel G, Zabarauskas A, Ngo CT, Coulombe-Huntington J, Majewski J, Richard S: The Sam68 STAR RNA-binding protein regulates mTOR alternative splicing during adipogenesis. *Mol Cell* 46:187-199, 2012.
191. Kim JE, Chen J: regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity by mammalian target of rapamycin and amino acids in adipogenesis. *Diabetes* 53:2748-2756, 2004.
192. Chawla G, Lin CH, Han A, Shiue L, Ares M, Jr., Black DL: Sam68 regulates a set of alternatively spliced exons during neurogenesis. *Mol Cell Biol* 29:201-213, 2009.
193. Lukong KE, Richard S: Targeting the RNA-binding protein Sam68 as a treatment for cancer? *Future Oncol* 3:539-544, 2007.

194. Liu K, Li L, Nisson PE, Gruber C, Jessee J, Cohen SN: Neoplastic transformation and tumorigenesis associated with sam68 protein deficiency in cultured murine fibroblasts. *J Biol Chem* 275:40195-40201, 2000.
195. Richard S, Vogel G, Huot ME, Guo T, Muller WJ, Lukong KE: Sam68 haploinsufficiency delays onset of mammary tumorigenesis and metastasis. *Oncogene* .: 2007.
196. McBride AE, Taylor SJ, Shalloway D, Kirkegaard K: KH domain integrity is required for wild-type localization of Sam68. *Exp Cell Res* 241:84-95, 1998.
197. Schwerk C, Schulze-Osthoff K: Methyltransferase inhibition induces p53-dependent apoptosis and a novel form of cell death. *Oncogene* 24:7002-7011, 2005.
198. Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nunez G, Thompson CB: bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74:597-608, 1993.
199. Clarke MF, Apel IJ, Benedict MA, Eipers PG, Sumantran V, Gonzalez-Garcia M, Doedens M, Fukunaga N, Davidson B, Dick JE, Minn AJ, Boise LH, Thompson CB, Wicha M, Nunez G: A recombinant bcl-x s adenovirus selectively induces apoptosis in cancer cells but not in normal bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11024-11028, 1995.
200. Olopade OI, Adeyanju MO, Safa AR, Hagos F, Mick R, Thompson CB, Recant WM: Overexpression of BCL-x protein in primary breast cancer is associated with high tumor grade and nodal metastases. *Cancer J Sci Am* 3:230-237, 1997.
201. Paronetto MP, Achsel T, Massiello A, Chalfant CE, Sette C: The RNA-binding protein Sam68 modulates the alternative splicing of Bcl-x. *J Cell Biol* 176:929-939, 2007.
202. Vhuiyan MI, Pak ML, Park MA, Thomas D, Lakowski TM, Chalfant CE, Frankel A: PRMT2 interacts with splicing factors and regulates the alternative splicing of BCL-X. *J Biochem* 2017.
203. Chen S, Li H, Zhuang S, Zhang J, Gao F, Wang X, Chen W, Song M: Sam68 reduces cisplatin-induced apoptosis in tongue carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 35:123, 2016.
204. Busa R, Paronetto MP, Farini D, Pierantozzi E, Botti F, Angelini DF, Attisani F, Vespasiani G, Sette C: The RNA-binding protein Sam68 contributes to proliferation and survival of human prostate cancer cells. *Oncogene* 26:4372-4382, 2007.

205. Paronetto MP, Cappellari M, Busa R, Pedrotti S, Vitali R, Comstock C, Hyslop T, Knudsen KE, Sette C: Alternative splicing of the cyclin D1 proto-oncogene is regulated by the RNA-binding protein Sam68. *Cancer Res* 70:229-239, 2010.
206. Kamalati T, Niranjana B, Atherton A, Anbazhagan R, Gusterson B: Differentiation antigens in stromal and epithelial cells of the breast. *Cancer Treat Res* 83:227-42.:227-242, 1996.
207. Zhang Z, Li J, Zheng H, Yu C, Chen J, Liu Z, Li M, Zeng M, Zhou F, Song L: Expression and cytoplasmic localization of SAM68 is a significant and independent prognostic marker for renal cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18:2685-2693, 2009.
208. Perez-Perez A, Sanchez-Jimenez F, Vilarino-Garcia T, de la Cruz L, Virizuola JA, Sanchez-Margalet V: Sam68 Mediates the Activation of Insulin and Leptin Signalling in Breast Cancer Cells. *PLoS One* 11:e0158218, 2016.
209. Vaishnav YN, Vaishnav M, Wong-Staal F: Identification and characterization of a nuclear factor that specifically binds to the Rev response element (RRE) of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *New Biol* 3:142-150, 1991.
210. Reddy TR: A single point mutation in the nuclear localization domain of Sam68 blocks the Rev/RRE-mediated transactivation. *Oncogene* 19:3110-3114, 2000.
211. McBride AE, Schlegel A, Kirkegaard K: Human protein Sam68 relocalization and interaction with poliovirus RNA polymerase in infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2296-2301, 1996.
212. McLaren M, Asai K, Cochrane A: A novel function for Sam68: enhancement of HIV-1 RNA 3' end processing. *RNA* 10:1119-1129, 2004.
213. Marsh K, Soros V, Cochrane A: Selective translational repression of HIV-1 RNA by Sam68DeltaC occurs by altering PABP1 binding to unspliced viral RNA. *Retrovirology* 5:97. doi: 10.1186/1742-4690-5-97.:97-5, 2008.
214. Song J, Richard S: Sam68 regulates S6K1 alternative splicing during adipogenesis. *Mol Cell Biol* 2015.
215. Quintana-Portillo R, Canfran-Duque A, Issad T, Sanchez-Margalet V, Gonzalez-Yanes C: Sam68 interacts with IRS1. *Biochem Pharmacol* 83:78-87, 2012.
216. Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4350-4354, 1979.

217. Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, Cahill DA, Goldstein BJ, White MF: Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 352:73-77, 1991.
218. Yeh WC, Bierer BE, McKnight SL: Rapamycin inhibits clonal expansion and adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11086-11090, 1995.
219. Cho HJ, Park J, Lee HW, Lee YS, Kim JB: Regulation of adipocyte differentiation and insulin action with rapamycin. *Biochem Biophys Res Commun* 321:942-948, 2004.
220. Wang H, Chen Y, Lu XA, Liu G, Fu Y, Luo Y: Endostatin Prevents Dietary-Induced Obesity by Inhibiting Adipogenesis and Angiogenesis. *Diabetes* 2015.
221. Mueller E, Drori S, Aiyer A, Yie J, Sarraf P, Chen H, Hauser S, Rosen ED, Ge K, Roeder RG, Spiegelman BM: Genetic analysis of adipogenesis through peroxisome proliferator-activated receptor gamma isoforms. *J Biol Chem* 277:41925-41930, 2002.
222. Mei B, Zhao L, Chen L, Sul HS: Only the large soluble form of preadipocyte factor-1 (Pref-1), but not the small soluble and membrane forms, inhibits adipocyte differentiation: role of alternative splicing. *Biochem J* 364:137-144, 2002.
223. Peterfy M, Phan J, Reue K: Alternatively spliced lipin isoforms exhibit distinct expression pattern, subcellular localization, and role in adipogenesis. *J Biol Chem* 280:32883-32889, 2005.
224. Zhou J, Cheng M, Boriboun C, Ardehali MM, Jiang C, Liu Q, Han S, Goukassian DA, Tang YL, Zhao TC, Zhao M, Cai L, Richard S, Kishore R, Qin G: Inhibition of Sam68 triggers adipose tissue browning. *J Endocrinol* 225:181-189, 2015.
225. Lane MD, Reed BC, Clements PR: Insulin receptor synthesis and turnover in differentiating 3T3-L1 preadipocytes. *Prog Clin Biol Res* 66 Pt A:523-42.:523-542, 1981.
226. Reed BC, Lane MD: Expression of insulin receptors during preadipocyte differentiation. *Adv Enzyme Regul* 18:97-117.:97-117, 1980.
227. Hwang CS, Mandrup S, MacDougald OA, Geiman DE, Lane MD: Transcriptional activation of the mouse obese (ob) gene by CCAAT/enhancer binding protein alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:873-877, 1996.
228. Hwang CS, Loftus TM, Mandrup S, Lane MD: Adipocyte differentiation and leptin expression. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13:231-59.:231-259, 1997.

- 
229. Venigalla RK, Turner M: RNA-binding proteins as a point of convergence of the PI3K and p38 MAPK pathways. *Front Immunol* 3:398, 2012.
  230. Najib S, Martin-Romero C, Gonzalez-Yanes C, Sanchez-Margalet V: Role of Sam68 as an adaptor protein in signal transduction. *Cell Mol Life Sci* 62:36-43, 2005.
  231. Kudo M, Sugawara A, Uruno A, Takeuchi K, Ito S: Transcription suppression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 gene expression by tumor necrosis factor alpha via an inhibition of CCAAT/ enhancer-binding protein delta during the early stage of adipocyte differentiation. *Endocrinology* 145:4948-4956, 2004.
  232. Ramji DP, Foka P: CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J* 365:561-575, 2002.
  233. Kim SJ, Choung SY: Inhibitory effects of *Aster spathulifolius* extract on adipogenesis and lipid accumulation in 3T3-L1 preadipocytes. *J Pharm Pharmacol* 68:107-118, 2016.
  234. Lee SH, Kim B, Oh MJ, Yoon J, Kim HY, Lee KJ, Lee JD, Choi KY: *Persicaria hydropiper* (L.) spach and its flavonoid components, isoquercitrin and isorhamnetin, activate the Wnt/beta-catenin pathway and inhibit adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells. *Phytother Res* 25:1629-1635, 2011.
  235. Qiao L, Zou C, Shao P, Schaack J, Johnson PF, Shao J: Transcriptional regulation of fatty acid translocase/CD36 expression by CCAAT/enhancer-binding protein alpha. *J Biol Chem* 283:8788-8795, 2008.
  236. Zang L, Xue B, Lu Z, Li X, Yang G, Guo Q, Ba J, Zou X, Dou J, Lu J, Pan C, Mu Y: Identification of LRP16 as a Negative Regulator of Insulin Action and Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocytes. *Horm Metab Res* 2013.

# Notas









