

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**ESTUDIO DE LA ALTERACIÓN EN LA  
EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN EL TEJIDO  
ADIPOSO OMENTAL Y SUBCUTÁNEO EN  
OBESIDAD MEDIANTE TÉCNICAS DE  
PROTEÓMICA**

**TESIS DOCTORAL**

**RAFAEL PÉREZ PÉREZ**

**Madrid 2011**



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
FACULTAD DE MEDICINA  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**ESTUDIO DE LA ALTERACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE  
PROTEÍNAS EN EL TEJIDO ADIPOSO OMENTAL Y  
SUBCUTÁNEO EN OBESIDAD MEDIANTE TÉCNICAS  
DE PROTEÓMICA**

Memoria que presenta Rafael Pérez Pérez,  
Licenciado en Bioquímica, para optar al título de  
Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid

Directora de Tesis:

Dra. M<sup>a</sup> Belén Peral Fuentes

Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, CSIC-UAM



**M<sup>a</sup>. Belén Peral Fuentes**, Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” de Madrid y Profesora Honoraria del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid,

CERTIFICA que: **Don Rafael Pérez Pérez**, licenciado en Bioquímica por la Universidad de Córdoba, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado:

**“Estudio de la alteración en la expresión de proteínas en el tejido adiposo omental y subcutáneo en obesidad mediante técnicas de proteómica ”**

y considera que el trabajo realizado reúne todas las condiciones requeridas por la legislación vigente, así como la originalidad y calidad científica necesarias, para poder ser presentado y defendido con el fin de optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste donde proceda, firman el presente certificado en Madrid a    de Diciembre de 2011.

Vº Bº Tutor de la Tesis

Fdo. Dra. M<sup>a</sup>. Belén Peral Fuentes  
Directora de la tesis doctoral

Fdo. Dr. Juan Bernal Carrasco  
Profesor Honorario del  
Departamento de Bioquímica  
de la UAM



Este trabajo ha podido llevarse a cabo gracias a la financiación de los proyectos SAF-2006-02354 y SAF-2009-10461 del Plan Nacional de Investigación Científica (I+D+I).



## **Agradecimientos...**

Quiero expresar mi agradecimiento a Belén Peral por su paciencia y dedicación en la dirección de esta Tesis Doctoral. Nada de lo que se describe en esta memoria hubiera sido posible sin el excelente trabajo de muchas personas, entre las que quiero destacar, a sabiendas de que no van a estar todos los que son, a Eva García Santos mi compañera de laboratorio por todo lo que he aprendido a su costa, Juan Antonio López, Emilio Camafeita y Enrique Calvo del Servicio de Proteómica del CNIC por su ayuda en todo lo relacionado con el 2D-DIGE, la espectrometría de masas, MALDI-TOF y la cromatografía multidimensional, a José Manuel Fernández-Real, Paco Ortega y José María Moreno por la obtención de las biopsias de tejido y por los estudios clínicos de las personas incluidas en este trabajo, y de manera especial a todos los pacientes del Hospital Dr. Josep Trueta de Girona que se han prestado a participar en este estudio. A todos ellos, muchas gracias.

## Resumen

La obesidad es una enfermedad de etiología multifactorial en la que intervienen factores genéticos y ambientales. En la actualidad constituye un serio problema de salud a nivel mundial debido al aumento del número de personas obesas y con sobrepeso tanto en los países desarrollados como en los países en vías de desarrollo. La obesidad se define como una acumulación excesiva de tejido adiposo debido a una alteración del balance entre la ingesta de alimento y el gasto energético y es una importante causa de morbilidad y mortalidad, porque supone un factor de riesgo en el desarrollo de patologías como la insulino-resistencia, la diabetes tipo 2 y la enfermedad cardiovascular, entre otras. El tejido adiposo se ha considerado durante décadas un tejido pasivo con la única función de almacenar grasas; sin embargo, hoy día, se reconoce como un importante órgano endocrino secretor de múltiples moléculas, entre ellas factores inflamatorios, que actúan localmente o en otros órganos como el cerebro, el páncreas o el hígado. Los seres humanos presentan dos depósitos grasos mayoritarios, el visceral y el subcutáneo. Con el fin de ahondar en el conocimiento de la biología del tejido adiposo en obesidad, en este trabajo de Tesis Doctoral se describe la identificación de proteínas diferencialmente expresadas en los dos depósitos grasos, así como proteínas reguladas en pacientes afectados por esta patología. Estos estudios se han realizado utilizando herramientas de Proteómica basadas en electroforesis bidimensional diferencial y espectrometría de masas. La investigación proteómica en los dos depósitos grasos ha subrayado una mayor actividad metabólica y un perfil inflamatorio más acentuado en el tejido adiposo omental con respecto al subcutáneo. Asimismo, el estudio comparativo de los proteomas entre individuos obesos y no-obesos ha destacado un perfil metabólico ralentizado en el tejido adiposo omental en obesidad, así como una sobre-expresión de proteínas relacionadas con cambios estructurales de las células en los individuos obesos. Varias de las proteínas identificadas se han estudiado más detalladamente utilizando otras estrategias con el fin de investigar su implicación en la patología. En particular, dos proteínas que no habían sido con anterioridad relacionadas con obesidad, la aminoacilasa 1 (ACY-1) y la transketolasa (TKT), podrían desempeñar una función relevante en el tejido adiposo omental en obesidad. Por último, re-analizando los datos de estos estudios proteómicos se han identificado proteínas de referencia en los depósitos omental y subcutáneo que podrán ser empleadas en futuros análisis de expresión proteica en obesidad.

## Summary

Obesity is recognized as one of the most important public health problems facing the world today. Prevalence is growing exponentially worldwide, both in developed and developing countries. An increased intake of energy-dense foods, especially when combined with reduced physical activity, surely contributes to this high prevalence. Obesity is defined medically as a state of increased adipose tissue of such magnitude to produce adverse health consequences. Obese subjects have an increased risk of suffering insulin resistance, type 2 diabetes and cardiovascular disease, among others. Previously considered an inert depot, fat is now regarded as a key, highly active and versatile organ with many important physiological and pathological roles. Most of the adipose tissue functions are carried out via molecules secreted by fat cells, capable of acting locally and in many non-adipose tissues, such as muscle, liver and stomach tissues, as well as nervous, immune and vascular systems. In humans, the adipose tissue is mainly shown in two compartments, the subcutaneous and the visceral fat depots. Numerous methods have been developed to study the adipose tissue, among them, Proteomics. Proteomics is the large-scale study of proteins in disease-related processes, at the whole cell or tissue level, and even in subcellular structures and in biological fluids. This approach has been used in this Thesis and several comparative proteomic studies have been performed (based on 2D-DIGE and MS), currently considered pioneers in the field of obesity. In a first study the subcutaneous and omental adipose tissue proteomes were compared highlighting the elevated metabolic activity and the higher inflammatory profile of the omental versus the subcutaneous fat; in a second study the omental adipose tissue from obese and non-obese subjects was compared underlining a clear distinctive proteomic pattern between the two group of individuals which underscore a reduced metabolic activity, together with morphological and structural cell changes in the obese fat. A few proteins have been deeply studied using different strategies to uncover their implication in obesity. Two proteins, transketolase (TKT) and aminoacylase-1 (ACY-1) represent newly described molecules with a possible role in the pathophysiology of obesity. Lastly, to uncover adipose tissue proteins equally expressed either in omental and subcutaneous fat depots or in omental fat from non-obese and obese individuals, the data from the proteomic studies were re-analyzed. In this way we have identified, for the first time to our knowledge, proper reference proteins to be used in expression studies in obesity.

# ÍNDICE

# Índice General

<i>Resumen/Summary</i>	- 1 -
<i>Índice</i>	- 3 -
<i>Índice de figuras</i>	- 6 -
<i>Índice de tablas</i>	- 8 -
<i>Abreviaturas</i>	- 9 -
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>- 13 -</b>
1.1. Distribución y organización del tejido adiposo.....	15 -
1.2. Metabolismo de las grasas en el tejido adiposo.....	17 -
1.2.1. Lipogénesis.....	17 -
1.2.2. Lipólisis.....	18 -
1.3. El tejido adiposo como órgano endocrino.....	19 -
1.3.1. Papel del tejido adiposo en la homeostasis energética y secreción de leptina.....	19 -
1.3.2. Adiponectina.....	21 -
1.3.3. Otras adiponquinas liberadas por el tejido adiposo.....	21 -
1.4. Estado inflamatorio asociado a la obesidad.....	22 -
1.5. Obesidad y patologías asociadas.....	23 -
1.6. Estrés del retículo endoplasmático en el tejido adiposo.....	23 -
1.7. Estudios genómicos y proteómicos previos.....	24 -
1.7.1. Estudios de expresión de mRNA en tejido adiposo.....	24 -
1.7.2. Estudios proteómicos en tejido adiposo humano.....	26 -
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>- 29 -</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>- 31 -</b>
3.1. Pacientes incluidos en el estudio.....	32 -
3.2. Técnicas de separación e identificación de proteínas.....	32 -
3.2.1. Preparación de las muestras para la electroforesis bidimensional.....	34 -
3.2.2. Electroforesis Bidimensional Convencional.....	34 -
3.2.3. Protocolo 2D-DIGE.....	35 -
3.2.4. Identificación de proteínas por espectrometría de masas.....	37 -
3.2.5. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.....	37 -
3.3. Inmunoensayos.....	38 -
3.3.1. Western-Blot.....	38 -
3.3.2. Inmunohistoquímica.....	39 -

## Índice

3.3.3. Inmunofluorescencia.....	- 40 -
3.3.4. Inmunoprecipitación.....	- 40 -
3.4. Tratamiento de los fibroblastos 3T3-L1 para inducir adipogénesis.....	- 41 -
3.5. Cultivo de células THP1 e inducción de la diferenciación.....	- 41 -
3.6. Construcción de la proteína recombinante transketolasa-HA (TKT-HA).....	- 42 -
3.7. Cultivo y transfección de células HeLa y HEK-293.....	- 42 -
3.8. Herramientas bio-informáticas.....	- 42 -
3.8.1. Análisis de interacciones con el Ingenuity Pathways Analysis (IPA).....	- 42 -
3.8.2. Clasificación funcional de las proteínas mediante el PANTHER.....	- 43 -
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>- 45 -</b>
4.1. Estudio proteómico comparativo entre el tejido adiposo omental y subcutáneo.....	- 46 -
4.1.1. Análisis de las proteínas identificadas en el estudio 2D-DIGE .....	- 50 -
4.1.2. Análisis “in silico” de las proteínas identificadas.....	- 51 -
4.1.3. Estudio de las proteínas diferencialmente expresadas.....	- 52 -
4.1.3.1. Estudio de las citoqueratinas epiteliales en tejido adiposo.....	- 52 -
4.1.3.2. Estudio de las “heat shock proteins” (HSPs).....	- 54 -
4.1.3.3. Análisis de la proteína fatty acid binding protein 5 (FABP5).....	- 56 -
➤ Estudio de la expresión de FABP5 y FABP4 en macrófagos.....	- 58 -
4.1.3.4. Validación de la proteína GAPDH.....	- 59 -
4.1.4. Búsqueda de proteínas con perfil de proteínas de referencia.....	- 61 -
4.2. Análisis proteómico comparativo mediante 2D-DIGE para el estudio de la obesidad.....	- 62 -
4.2.1. Análisis “in silico” de las proteínas identificadas.....	- 63 -
4.2.2. Análisis de las proteínas identificadas en el estudio 2D-DIGE .....	- 65 -
4.2.3. Estudio de las proteínas diferencialmente expresadas.....	- 68 -
4.2.3.1. Estudio de la proteína transketolasa (TKT).....	- 68 -
➤ Estudio de identificación de interacciones para la proteína TKT.....	- 71 -
4.2.3.2. Estudio de la proteína aminoacilasa-1 (ACY-1).....	- 72 -
4.2.3.3. Análisis de la proteína HSP70.....	- 76 -
4.2.4. Búsqueda de proteínas con perfil de proteínas de referencia en el estudio comparativo de la obesidad.....	- 77 -
4.3. Reflexiones finales.....	- 80 -
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>- 82 -</b>
<i>Bibliografía</i>	- 85 -
<i>Publicaciones</i>	- 97 -

# Índice de Figuras

1: Activación de la lipogénesis en el adipocito.....	- 18 -
2: Esquema de la secuencia de acciones que se llevan a cabo en un experimento 2D-DIGE.....	- 36 -
3: Geles bidimensionales teñidos con plata, realizados en un rango de pH de 4-7.....	47 -
4: Imágenes de los geles bidimensionales realizados en un rango de pH de 3-11 NL.....	48 -
5: Red generada por Ingenuity mediante relaciones directas.....	52 -
6: Expresión de CK-8 y CK-18 en tejido adiposo omental humano.....	53 -
7: Inmunohistoquímica de CK-18 en tejido adiposo omental y subcutáneo humano.....	54 -
8: Western-blot representativos de las HSPs y de la GRP78 empleando muestras de tejido adiposo omental y subcutáneo de 6 pacientes.....	55 -
9: Sobre-expresión de FABP5 en el tejido adiposo omental respecto del subcutáneo.....	57 -
10: Detección mediante inmunofluorescencia en tejido adiposo omental de FABP5 y CD68.....	58 -
11: Expresión de FABP4, en tejido, en la SVF y en los adipocitos aislados del depósito graso omental y del subcutáneo.....	58 -
12: Expresión de FABP5 y FABP4 en células THP1.....	59 -
13: Expresión de FABP4 y FABP5 en macrófagos extraídos de ratones elicidos con tioglicolato y tratados con PMA.....	60 -
14: Expresión de proteínas comúnmente denominadas proteínas de referencia en muestras pareadas de tejido adiposo omental y subcutáneo.....	61 -
15: Estudio de proteínas identificadas en el estudio 2D-DIGE en pares de tejido adiposo omental y subcutáneo con perfil de expresión de proteínas de referencia.....	61 -
16: Imágenes de los geles bidimensionales correspondientes al estudio comparativo del tejido adiposo omental de obesos y no obesos.....	63 -
17: Representación del análisis mediante la aplicación PANTHER.....	66 -
18: Validación por WB de varias proteínas identificadas en el estudio proteómico comparativo.....	69 -
19: Detección por inmunofluorescencia de la TKT.....	70 -
20: Expresión de TKT, ACY-1 y SPHK1 en la diferenciación de fibroblastos 3T3-L1.....	71 -
21: Detección de la ACY-1 en cortes de tejido adiposo omental humano.....	74 -
22: Inmunofluorescencia de ACY-1 en preadipocitos humanos y en adipocitos humanos diferenciados <i>in vitro</i> .....	74 -

## Índice

23: Inmunofluorescencia de ACY-1 en fibroblastos 3T3-L1 .....	- 75 -
24: Comparación de la expresión de HSP70 en el tejido adiposo omental de obesos sin DM-2 (Ob) y obesos con DM-2 (Db).....	- 77 -
25: Expresión de proteínas de referencia en muestras de tejido adiposo omental de obesos (Ob) y de no obesos (n-Ob).....	- 77 -
26: Identificación de proteínas con perfil de proteínas de referencia entre obesos y no obesos.....	- 78 -
27: Comportamiento de proteínas de referencia en individuos n-Ob frente a Ob con DM-2 (Db).....	- 79 -

# Índice de Tablas

1: Relación entre el IMC y el grado de obesidad.....	- 14 -
2: Algunas adiponectinas producidas en el tejido adiposo y el efecto principal que producen.....	- 21 -
3: Características de los pacientes incluidos en esta Tesis Doctoral.....	- 33 -
4: Anticuerpos empleados en los WB de esta Tesis Doctoral.....	- 39 -
5: Anticuerpos empleados en las inmunohistoquímicas e inmunofluorescencias de esta Tesis Doctoral.....	- 40 -
6: Proteínas identificadas con expresión diferente entre el depósito graso omental y el subcutáneo.....	- 49 -
7: Proteínas identificadas con expresión diferente en el depósito graso omental debido a la obesidad.....	- 64 -
8: Algunas proteínas incluidas en los términos de GO representados con significación estadística en los conjuntos de proteínas disminuidas y aumentadas con la obesidad.....	- 66 -
9. Proteínas identificadas mediante LC-MS en las co-IP.....	- 73 -

## ABREVIATURAS

2D	electroforesis bidimensional
2D-PAGE	electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida
ACY-1	aminoacilasa-1
AgRP	<i>agouti-related peptide</i>
ATF6	factor activador de la transcripción 6
ATP	adenosina trifosfato
BVA	<i>DeCyder Biological Variation Analysis</i>
CALX	calnexina
cAMP	AMP cíclico
CART	<i>cocaine and amphetamine related transcript</i>
CEBPs	CCAAT/enhancer-binding proteins
CHAPS	sulfonato de 3-[(3-cholamidopropil)dimetilamonio]-1-propano
CoA	coenzima A
co-IP	co-immunoprecipitación
CSF-1	factor estimulador de colonias-1
CV	coeficiente de variación
DBP	presión diastólica
DDB1	<i>damage-specific DNA binding protein 1</i>
DIA	DeCyder Differential In Gel Analysis
DIGE	<i>Differential in Gel Electrophoresis</i>
DM-2	diabetes de tipo 2
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DTT	ditiotreitol
EC	endocannabinoide
eIF2- $\alpha$	subunidad $\alpha$ del factor 2 de iniciación de la traducción
ENOA	<i>enolase 1</i>
FAA	<i>fumarylacetoacetate</i>
FABP4	<i>fatty acid binding protein 4</i>
FABP5	<i>fatty acid binding protein 5</i>
GAPDH	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GLUT4	<i>glucose transporter type 4</i>
GO	Gene Ontology
GRP78	proteína relacionada con glucosa 78
GRP94	proteína relacionada con glucosa 94
H	hora
HED	hidroxietildisulfuro
HSL	lipasa sensible a hormonas

HSPs	<i>heat shock proteins</i>
IEF	isoelectroenfoque
IL-6	interleuquina-6
IMC	índice de masa corporal
IPA	ingenuity pathways analysis
IPG	<i>immobilized pH gradient</i>
IRE1- $\alpha$	enzima dependiente de inositol
LC-MS	cromatografía líquida acoplada a spectrometría de masas
MALDI-TOF	matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flyght
MAOA	<i>monoamine oxidase A</i>
MCP-1	proteína atrayente de monocitos-1
MGLL	monoglicerido lipasa
mRNA	ARN mensajero
MS	espectrometría de masas
$\alpha$ -MSH	$\alpha$ - <i>Melanocyte-stimulating hormone</i>
NAD $^+$	nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NPY	neuropéptido Y
ORF	marco abierto de lectura
PAI-1	inhibidor del activador del plasminógeno-1
PANTHER	<i>protein Analysis Through Evolutionary Relationship</i>
PARK7	<i>parkinson disease protein 7</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCA	análisis de componentes principales
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PERK	<i>RNA-dependent protein kinase-like ER kinase</i>
PGK1	<i>phosphoglycerate kinase 1</i>
PKA	proteína kinasa A
PMA	<i>phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
PPAR- $\gamma$	receptor activador de la proliferación de peroxisomas
RBP4	<i>retinol binding protein 4</i>
RE	retículo endoplasmático
RIPA	<i>radioimmuno precipitation assay</i>
rpm	revoluciones por minuto
S1P	esfingosina 1 fosfato
SDS	dodecil sulfato de sodio
SPB	presión sistólica
SPHK1	<i>sphingosine kinase 1</i>

SREBP-1	<i>sterol regulatory element-binding protein 1</i>
SVF	fracción estroma-vascular
TBB5	beta-tubulina
TGF-β	<i>transforming Growth Factor-β</i>
TKT	transketolasa
TKT-HA	transketolasa-HA
TNF-α	tumor necrosis factor- α
TOF	time Of Flyght
UCP-1	<i>uncoupling protein-1</i>
UPR	respuesta al desplegamiento de proteínas
V	voltios
VLDL	very low density lipoprotein
WB	western-Blot
Wnt	<i>wingless-related MMTV integration site 4</i>
XBP-1	<i>X-box binding protein</i>

# 1. INTRODUCCIÓN

Una gran parte de la sociedad actual considera que la obesidad es un simple defecto estético; sin embargo, más allá de afectar negativamente a los actuales cánones de belleza, la obesidad aumenta el riesgo de sufrir toda una serie de patologías, desde síndrome de apnea de sueño hasta determinados tipos de cáncer (Calle and Kaaks, 2004, Renehan et al., 2008). Es una condición propia de naciones desarrolladas o en vías de desarrollo, en definitiva de ambientes en los que se combinan las comidas hipercalóricas y la baja actividad física. La obesidad está alcanzando proporciones epidémicas en muchas partes del globo por lo que se está convirtiendo en uno de los principales problemas de salud mundiales. En las zonas donde se observan las mayores frecuencias de obesidad, Norte América y Europa (Haslam and James, 2005), este fenómeno está afectando cada vez en mayor medida a niños (Daniels et al., 2009); por tanto, el actual problema de la obesidad a nivel mundial no ha hecho más que empezar y si no somos capaces de detener los actuales hábitos, la obesidad afectará a un número mayor de personas.

La obesidad se define como una acumulación desmesurada de tejido adiposo derivada de una alteración del balance entre ingesta y gasto de energía, además se considera una enfermedad multifactorial en la que muchos genes interaccionan entre sí, con la edad y con el ambiente. La obesidad se mide en términos de índice de masa corporal (IMC) el cual se expresa como el peso en kilogramos dividido por el cuadrado de la altura en metros, se considera que una persona tiene obesidad cuando su IMC está por encima de 30 (Tabla 1). Este índice no es una medida completamente fiable a la hora de cuantificar el sobrepeso de una persona, por este motivo también se emplean el perímetro de cintura y la relación cintura/cadera para determinar cómo es la acumulación de grasa desde el punto de vista anatómico. Estas relaciones permiten determinar la mayor o menor probabilidad que tiene una persona de sufrir enfermedades asociadas a obesidad (Qiao and Nyamdjorj, 2010). Los umbrales por encima de los cuales se incrementa el riesgo de sufrir complicaciones metabólicas para las mujeres son: un perímetro de cintura superior a 80 cm y una relación cintura/cadera por encima de 0,8, y para los hombres un perímetro de cintura por encima de 94 cm y una relación cintura/cadera por encima de 1,0 (Welborn and Dhaliwal, 2007).

**Tabla 1: Relación entre el IMC y el grado de obesidad.**

IMC ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )	Grado de obesidad
Menor de 18	Malnutrición
Entre 18 y 25	Normo peso
Entre 25 y 30	Sobrepeso

IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Grado de obesidad
Entre 30 y 35	Obesidad de tipo 1
Entre 35 y 40	Obesidad de tipo 2
Mayor de 40	Obesidad de tipo 3 o mórbida

Tradicionalmente no se ha prestado mucha atención al estudio del tejido adiposo debido a que éste era considerado un órgano encargado de almacenar el exceso de energía en forma de grasas. Sin embargo, los descubrimientos en 1987 de que el tejido adiposo desempeñaba un papel clave en el metabolismo de las hormonas sexuales esteroideas (Siiteri, 1987), y de la menor producción de adipsina en ratones obesos (Flier et al., 1987), prepararon el terreno para cambiar la mentalidad científica. En 1994 el descubrimiento de la leptina estableció que el tejido adiposo actuaba como un órgano endocrino que intervenía en la homeostasis energética (Zhang et al., 1994). A partir de ahí se han descubierto una serie de factores hormonales derivados del tejido graso que median en la señalización de numerosos procesos entre ellos la homeostasis energética, la regulación de la presión sanguínea, la función inmune, la función reproductora, la masa ósea, etc.

### 1.1. Distribución y organización del tejido adiposo

Hay dos tipos de tejido adiposo, el tejido adiposo marrón (o grasa parda) y el tejido adiposo blanco. La principal función descrita hasta el momento para la grasa parda es la de generar calor, revisado en (Ravussin and Galgani, 2010), gracias a la proteína de la membrana interna mitocondrial *uncoupling protein-1* (UCP-1) que disipa el gradiente electroquímico en forma de calor. El tejido adiposo marrón aparece únicamente en mamíferos y es especialmente abundante en los recién nacidos ya que les permite mantener el calor corporal al pasar del vientre de la madre, donde la temperatura es óptima, al exterior, donde la temperatura puede llegar a ser bastante baja. Los adipocitos marrones presentan múltiples gotas lipídicas y numerosas mitocondrias circulares de gran tamaño que confieren una cierta tonalidad oscura, que es lo que da el nombre a este tejido. Con el desarrollo, el tejido adiposo marrón va desapareciendo e incluso se llegó a pensar que desaparecía por completo. Se ha descubierto, sin embargo, que en los adultos se encuentran algunos acúmulos de tejido adiposo marrón muy escasos y dispersos (Virtanen et al., 2009).

En general, cuando se cita el tejido adiposo se hace referencia al tejido adiposo blanco, que es el que está implicado en la obesidad, y por tanto a él nos referimos cuando hablamos de tejido adiposo en este texto. A diferencia de la grasa parda los adipocitos del

tejido adiposo blanco presentan una única gota lipídica que ocupa la mayor parte del citoplasma. El tejido adiposo es un órgano extraordinariamente heterogéneo en cuanto a su composición y a su distribución corporal. Además de los adipocitos, el tejido adiposo está compuesto de una matriz de tejido conectivo, tejido nervioso, células del sistema inmune y vasos (Frayn et al., 2003). Se diferencian dos depósitos principales de tejido adiposo: el depósito subcutáneo correspondiente al tejido adiposo que se localiza bajo la piel, y el depósito intraperitoneal, que se localiza dentro de la cavidad peritoneal donde se encuentra el tejido adiposo visceral. Hay dos tipos de tejido adiposo visceral: el mesentérico y el omental (Marin et al., 1992). El primero se encuentra envolviendo al intestino, el segundo consiste en una especie de delantal que se extiende desde la parte inferior del estómago recubriendo el abdomen y es el que normalmente se emplea en el estudio de la grasa visceral. Hace tiempo que se sabe que el tejido adiposo visceral y el subcutáneo presentan numerosas diferencias anatómicas, celulares y moleculares (Montague and O'Rahilly, 2000, Wajchenberg, 2000); por ejemplo, la irrigación de ambos tejidos es diferente (Björntorp, 1990), y los niveles de RNA mensajero (mRNA) de leptina en el tejido adiposo subcutáneo están incrementados respecto del visceral (Montague et al., 1997). Estos tejidos también son diferentes en cuanto a la capacidad de movilización de ácidos grasos, la grasa omental es más sensible a los efectos lipolíticos de las catecolaminas y menos sensible a los efectos antilipolíticos de la insulina; por tanto, este tejido tiene una mayor capacidad de movilización de ácidos grasos que el depósito subcutáneo (Björntorp, 1991, Hellmer et al., 1992). Adicionalmente hay descritas numerosas diferencias entre el tejido adiposo omental y subcutáneo referentes a la secreción de adiponectinas (Fain et al., 2004).

Se diferencian una obesidad periférica que se caracteriza por una acumulación de tejido adiposo subcutáneo y es más frecuente en mujeres. Este tipo de obesidad no se ha asociado a un mayor riesgo de sufrir patologías asociadas (Snijder et al., 2003). Por otro lado, la obesidad central o abdominal es más frecuente en hombres y consiste en una acumulación de tejido adiposo visceral. Este tipo de obesidad se ha asociado, mediante estudios epidemiológicos, con un mayor riesgo de sufrir enfermedades tales como resistencia a la insulina, diabetes de tipo II, hipertensión, etc. (Fox et al., 2007); sin embargo no se conoce el mecanismo molecular subyacente. No obstante, se han propuesto algunas teorías para explicar tales observaciones.

La teoría portal propone que la irrigación portal que recibe el hígado procedente del tejido adiposo visceral sería la responsable de las alteraciones metabólicas, de manera que en un estado de obesidad abdominal habría una elevada secreción de ácidos grasos y

factores inflamatorios que a través de la vena porta accederían al hígado donde tienen efectos nocivos sobre su función biológica (Rytka et al., 2011). Otra teoría sugiere que los adipocitos del tejido adiposo subcutáneo y visceral tienen diferentes propiedades de manera intrínseca. Se ha descrito que el patrón de expresión génica es muy diferente cuando se considera tanto el tejido total como los adipocitos y los preadipocitos de los depósitos subcutáneo y visceral de ratones y de humanos (Gesta et al., 2006), lo cual apoya la teoría que propone que ambos tejidos podrían proceder de diferentes linajes durante el desarrollo. Esta teoría se ha visto reforzada por experimentos de trasplante de tejido adiposo en ratones. Mientras que la inserción de tejido subcutáneo desde un donante a una localización visceral de un receptor tiene efectos beneficiosos sobre este último, la inserción de tejido adiposo visceral desde un donante a una localización subcutánea del receptor tiene un ligero efecto perjudicial (Tran et al., 2008).

## 1.2. Metabolismo de las grasas en el tejido adiposo

Como tradicionalmente se ha descrito, el tejido adiposo es el principal punto de almacenaje de energía en forma de triglicéridos o grasa. Los adipocitos contienen la maquinaria necesaria para el metabolismo de los lípidos. Llevan a cabo la lipogénesis, la síntesis de triglicéridos, los cuales una vez sintetizados son almacenados en la gota lipídica; también realizan la lipólisis, proceso mediante el cual los triglicéridos son convertidos en glicerol y en ácidos grasos que pasan al torrente sanguíneo donde son dirigidos hacia los tejidos que demandan un aporte de energía.

### 1.2.1. Lipogénesis

Las dietas ricas en azúcares y grasas propician un aumento de peso debido a que se favorece la síntesis y deposición de triglicéridos en el tejido adiposo. Sin embargo, hay una creencia generalizada en que las dietas ricas en proteínas facilitan una pérdida de peso porque los aminoácidos no se transforman en grasas; sin embargo, el exceso de proteínas propicia que los esqueletos carbonados de los aminoácidos se transformen en glucosa, la cual puede convertirse en grasa.

La lipogénesis es el proceso por el cual se sintetizan triglicéridos o grasas. Ocurre principalmente en los adipocitos y en el hígado. En los adipocitos comienza con la captación de glucosa mediada por el transportador de glucosa 4 (GLUT4), el cual es colocado en la membrana plasmática gracias a la acción de la insulina. Además, la insulina también lleva a cabo una inducción de las enzimas implicadas en la lipogénesis (Moustaid et

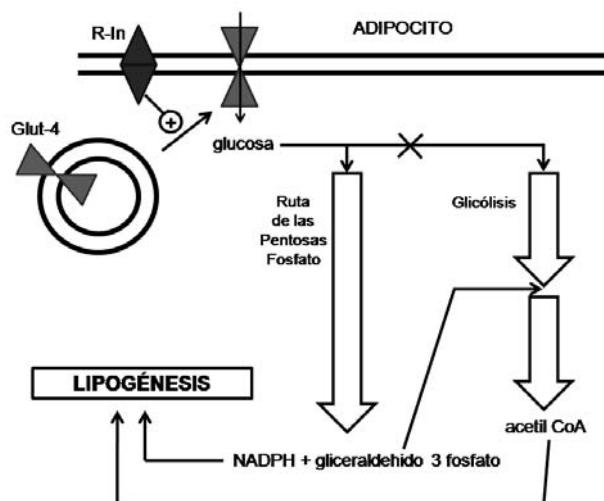
al., 1996). En condiciones de alto aporte energético cuando la actividad del ciclo de Krebs es máxima se generan altas concentraciones de ácido cítrico que favorecen:

--La activación de la enzima acetil-CoA carboxilasa, enzima que regula el flujo de la síntesis de ácidos grasos.

--La inhibición de la fosfofructosa quinasa, de manera que la glucosa se dirige hacia la ruta de las pentosas fosfato en detrimento de la ruta glicolítica para permitir la síntesis de altos niveles de NADPH que son requeridos durante la lipogénesis; además el gliceraldehido-3-fosfato generado en la ruta de las pentosas fosfato entra en la ruta glicolítica para generar acetil-CoA, que se emplea en la síntesis de ácidos grasos (figura 1).

La enzima acetil-CoA carboxilasa junto con la sintasa de ácidos grasos llevan a cabo la síntesis de ácidos grasos. A continuación la enzima acyl-transferasa transfiere de manera sucesiva 3 ácidos grasos hasta el glicerol para generar triacilglicerol, que se almacena en la gota lípida del adipocito. Por otro lado, los triglicéridos que genera el hígado son dirigidos hacia el tejido adiposo en forma de apolipoproteínas VLDL. Una vez que llegan al tejido adiposo, la lipoproteína lipasa permite la captación de los ácidos grasos que portan estas partículas. De esta manera los ácidos grasos que proceden del hígado se convierten en triglicéridos en el tejido adiposo para su almacenaje.

**Figura 1: Activación de la lipogénesis en el adipocito.** La insulina se une a su receptor (R-In) y dirige a Glut-4 hacia la membrana plasmática, lo que permite la entrada de glucosa. Cuando los niveles de energía son altos, la glucosa se dirige hacia la ruta de las pentosas fosfato, que genera NADPH y gliceraldehido-3-fosfato. Este último entra en la glucólisis originando acetil CoA que junto con el NADPH se emplean para almacenar el exceso de energía en forma de grasas en el proceso denominado lipogénesis.



### 1.2.2. Lipólisis

La lipólisis es el proceso mediante el cual los triglicéridos almacenados en la gota lípida de los adipocitos se transforman en 3 moléculas de ácido graso y una molécula de glicerol que pasan al torrente sanguíneo. En los adipocitos hay una tasa de lipólisis basal por la cual los triglicéridos son lisados continuamente. Además la lipólisis está altamente regulada por la adrenalina, la noradrenalina y por la insulina. Las catecolaminas se unen en

la membrana plasmática de los adipocitos a los receptores  $\beta$ -adrenérgicos y a los  $\alpha_2$ -adrenérgicos, mientras que los primeros potencian la lipólisis los segundos la inhiben. Los receptores adrenérgicos están acoplados a proteínas G que modulan la acción de la adenilato ciclase, ésta sintetiza AMP cíclico (cAMP) a partir del ATP. El cAMP media en la activación de la proteína quinasa A (PKA) que fosforila a la lipasa sensible a hormonas (HSL) que es la enzima limitante en la lipólisis. La HSL genera diacilglicerol y monoacilglicerol a partir de los triglicéridos. El último paso de la lipólisis se lleva a cabo por una monoglicérido lipasa (MGL) que rompe el monoacilglicerol en un ácido graso y en glicerol. Este último es liberado al torrente sanguíneo a través de una proteína de membrana denominada aquaporina. El transporte de ácidos grasos no está completamente descrito aunque se conocen algunas proteínas que median en él como por ejemplo la caveolina-1 o el CD36/FAT (Abumrad et al., 1993). Una vez en el torrente sanguíneo los ácidos grasos son captados por otros tejidos para obtener energía. La inhibición de la lipólisis está mediada por el receptor  $\alpha_2$ -adrenérgico acoplado a la proteína Gi y por el receptor de la insulina. La activación del receptor de la insulina del adipocito lleva a la activación de la enzima fosfodiesterasa 3 B que rompe el cAMP lo cual conduce a la inactivación de la PKA.

### 1.3. El tejido adiposo como órgano endocrino

Anteriormente se citó que a día de hoy el tejido adiposo es considerado un órgano endocrino que secreta factores solubles denominados adiponectinas que intervienen en la regulación de la homeostasis energética, en la respuesta inmune, en el control de la presión sanguínea, etc.

#### 1.3.1. Papel del tejido adiposo en la homeostasis energética y secreción de leptina

El balance de energía puede resumirse en la siguiente ecuación:

$$\text{energía incorporada} = \text{energía quemada} + \text{energía almacenada}$$

La leptina es una proteína multifuncional de 16 kDa secretada principalmente por los adipocitos y es fundamental en la regulación del balance energético. La secreción de leptina es proporcional a la masa de tejido adiposo y al estatus nutricional, actúa reprimiendo la ingesta de alimento y promoviendo el gasto de energía. Los niveles de leptina aumentan con la ingesta de energía y disminuyen rápidamente con el ayuno, no obstante, en la secreción de leptina influyen toda una serie de factores como la insulina, los

glucocorticoides, los estrógenos, los andrógenos, los ácidos grasos, los agonistas del receptor activador de la proliferación de peroxisomas (PPAR- $\gamma$ ), etc.

El receptor de leptina es muy abundante en el hipotálamo, sin embargo, también se halla en numerosos tejidos periféricos a unos niveles más bajos. La activación del receptor de leptina en el hipotálamo promueve la síntesis de la expresión de péptidos anorexigénicos (aquellos que reprimen el apetito) y reprime la expresión de péptidos orexigénicos (aquellos que activan el apetito) (revisado en (Spiegelman and Flier, 2001). La leptina actúa sobre dos poblaciones de neuronas del hipotálamo. En una población actúa reduciendo la expresión de los neuropéptidos *Neuropeptide Y* (NPY) y *Agouti-related peptide* (AgRP), los cuales promueven rutas orexigénicas. La otra población de neuronas co-expresa los péptidos anorexigénicos, *cocaine and amphetamine related transcript* (CART) y  $\alpha$ -*Melanocyte-stimulating hormone* ( $\alpha$ -MSH), la leptina lleva a cabo una inducción de la expresión de dichos péptidos. Se ha descrito que en obesidad hay un estado de resistencia a la leptina (Flier, 2004), de manera que unos elevados niveles de esta hormona no podrían invertir el balance de energía. Esto se debe a que el organismo está diseñado para mantener el mayor tamaño alcanzado, según predice la teoría de James Neels del “thrifty gene” (Neel, 1962). Según esta teoría determinados genes favorecen la deposición de grasa y el aumento de peso. Estos genes serían beneficiosos en las condiciones correspondientes al estilo de vida de los antepasados del hombre, donde las comidas eran escasas e impredecibles y los períodos de hambruna frecuentes. Sin embargo, hoy día el estilo de vida es radicalmente distinto, se hacen varias comidas diarias y la actividad física es muy escasa, de manera que esos mismos genes que antaño fueron beneficiosos para el hombre hoy día favorecen el desarrollo de la obesidad.

Por otro lado la leptina tiene numerosos efectos sobre tejidos periféricos tales como el hígado, músculo, hueso, páncreas, etc (revisado en (Margetic et al., 2002). De entre todas las acciones periféricas de la leptina podríamos destacar: que la administración de leptina exógena a ratones ob/ob esteriles corrige la esterilidad (Barash et al., 1996). La leptina también promueve proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas, normaliza la función inmune alterada a consecuencia de la malnutrición y acelera la cicatrización de heridas; además la leptina mejora la sensibilidad a la insulina del músculo e hígado. En el páncreas la leptina lleva a cabo una inhibición de la secreción de insulina, por lo que se habla de un eje de comunicación entre tejido adiposo e islotes de Langerhans.

### 1.3.2. Adiponectina

Resulta curioso que la adiponectina fuese descubierta entre el año 1995 y el 1996 simultáneamente por cuatro grupos (Scherer et al., 1995, Hu et al., 1996, Maeda et al., 1996, Nakano et al., 1996). Es una adipoquina expresada a altas dosis exclusivamente por los adipocitos y mantiene unos niveles muy elevados en plasma en comparación con los niveles que normalmente presentan otras hormonas. La adiponectina es una proteína de 30 kDa que presenta un dominio globular carboxilo terminal y un dominio amino terminal similar al colágeno que hace que se formen multímeros de esta hormona, de manera que podemos encontrar trímeros, tetrámeros incluso multímeros de hasta 18 unidades circulando en el torrente sanguíneo. En plasma también podemos encontrar una forma de adiponectina que sólo presenta el dominio globular y se origina como consecuencia de una rotura proteolítica de la proteína original. Se han descrito dos receptores de adiponectina el AdipoR1 y el AdipoR2, ambos son muy abundantes en músculo y en el hígado (Yamauchi et al., 2003).

Hay establecida una relación inversa entre los niveles de adiponectina en plasma y tanto la resistencia a la insulina como los estados inflamatorios. Además se han descrito varios polimorfismos en el gen de la adiponectina que están asociados con obesidad y con resistencia a insulina (Chandran et al., 2003, Diez and Iglesias, 2003). Estos estudios sugieren que bajos niveles de adiponectina se asocian a la patogénesis de tales alteraciones. También se ha descrito que los niveles de adiponectina están inversamente correlacionados con el índice de masa corporal (Rajala et al., 2003, Banerjee et al., 2004).

### 1.3.3. Otras adipoquinas liberadas por el tejido adiposo

Hay una gran lista de factores que son liberados por el tejido adiposo que afectan al metabolismo de una manera u otra, se ha resumido en la tabla 2.

**Tabla 2: Algunas adipoquinas producidas en el tejido adiposo y el efecto principal que producen.**

Adipoquina	Respuesta fisiológica que promueve
<i>Resistin</i>	Promueve resistencia a insulina e incrementa la producción de glucosa (Banerjee et al., 2004)
<i>Adipsin</i>	Estimula el almacenamiento de triglicéridos e inhibe la lipólisis (Cianflone et al., 2003)
<i>Acylation stimulating protein</i>	Estimula la captación de ácidos grasos, la síntesis de grasas e inhibe la lipólisis (Cianflone et al., 2003)
<i>Retinol binding protein 4</i>	Promueve resistencia a insulina (Esteve et al., 2009)

Adipoquina	Respuesta fisiológica que promueve
<i>Plasminogen activator inhibitor-1</i>	Predispone al estado pro-trombótico asociado a la obesidad (Mertens and Van Gaal, 2002, Juhani-Vague et al., 2003)
<i>Angiotensinogen</i>	Incrementa la presión sanguínea (Massiera et al., 2001)

#### 1.4. Estado inflamatorio asociado a la obesidad

Asociada a la obesidad hay una respuesta inflamatoria crónica de bajo grado que está caracterizada por una producción alterada de adipoquinas y por incrementos en marcadores biológicos de inflamación tales como el TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral), la IL-6 (interleuquina-6) y la MCP-1 (proteína atrayente de monocitos-1), entre otros factores (Neels and Olefsky, 2006). Las células responsables de este estado inflamatorio son principalmente leucocitos y macrófagos, aunque el resto de tipos celulares del tejido adiposo, también influyen en dicho estado (Weisberg et al., 2003). Los macrófagos residentes en el tejido adiposo de una persona no obesa se denominan macrófagos M2. Éstos se caracterizan por una expresión incrementada de genes antiinflamatorios (Lumeng et al., 2007). Sin embargo, la expansión del tejido adiposo con la obesidad está asociada con una infiltración de macrófagos M1 procedentes del torrente sanguíneo, éstos presentan un fenotipo pro-inflamatorio y son normalmente reclutados hacia puntos en que hay daño tisular. En un estado de obesidad los adipocitos presentan una expresión incrementada de MCP-1 y CSF-1 (factor estimulador de colonias-1) que podrían ser responsables, al menos en parte, del reclutamiento de monocitos desde la circulación hasta el tejido adiposo (Weisberg et al., 2006).

Como consecuencia de la elevada infiltración de macrófagos en el tejido adiposo en obesidad, aparece un aumento en los niveles de una serie de adipoquinas, entre las que cabe destacar al TNF- $\alpha$ , IL-6, al PAI-1 (inhibidor del activador del plasminógeno-1) y al MCP-1. Aunque los adipocitos maduros pueden liberar TNF- $\alpha$ , los macrófagos son los principales responsables de su producción en el tejido adiposo (Weisberg et al., 2003). Hace tiempo se publicó que el mRNA del TNF- $\alpha$  estaba incrementado en el tejido adiposo en condiciones de obesidad (Hotamisligil et al., 1993). Además distintos estudios han demostrado que esta citoquina puede inhibir la señalización por insulina (Ruan et al., 2002), motivo por el cual el TNF- $\alpha$  contribuye al desarrollo de la resistencia a insulina inducida por la obesidad.

La IL-6 es una adipoquina sintetizada por los adipocitos pero su liberación se debe mayoritariamente a los macrófagos del tejido adiposo. Es conocido que los niveles en suero de esta citoquina están aumentados con la obesidad (Roytblat et al., 2000), además está

incrementada tanto su expresión como su secreción en el depósito graso omental respecto del subcutáneo (Fain et al., 2004), lo cual está de acuerdo con la peor prognosis de la obesidad abdominal. También se ha publicado que esta adiponectina disminuye la señalización mediada por el receptor de insulina (Senn et al., 2003).

### **1.5. Obesidad y patologías asociadas**

La obesidad predispone a sufrir una serie de patologías tanto relacionadas con el exceso de peso tales como artritis (Felson et al., 1988), trastornos del sueño, discriminación social y depresión, como asociadas con los trastornos metabólicos tales como resistencia a insulina, enfermedad cardiovascular y cáncer, revisado en (Bray, 2004). En este último caso la relación a nivel epidemiológico no deja lugar a dudas, sin embargo, a nivel molecular no está clara la conexión entre la obesidad y las patologías asociadas. Todo apunta a que la alteración en la secreción de adiponectinas junto con el estado inflamatorio que sufre el tejido adiposo en condiciones de obesidad serían los principales responsables de mediar en dicha relación, una posible secuencia simplificada de acontecimientos se describe a continuación: (Guilherme et al., 2008) Ante una elevada ingesta de calorías se produciría un aumento de tamaño de los adipocitos que llegado a un determinado umbral cambiarían su perfil secretor de una manera radical. Los adipocitos hipertrofiados secretarían grandes cantidades de MCP-1 (Sartipy and Loskutoff, 2003) lo que potenciaría el reclutamiento de macrófagos. Por otro lado, el tejido adiposo en obesidad presenta un estado inflamatorio en el que se liberan altos niveles de TNF- $\alpha$  y de interleuquina 1- $\beta$  entre otras citoquinas pro-inflamatorias. La acción de dichas citoquinas consistiría en incrementar la lipólisis y reducir el almacenaje de triglicéridos, lo cual llevaría a unos altos niveles de ácidos grasos libres en sangre que causarían una acumulación ectópica de triglicéridos en músculo e hígado. Los ésteres de ácido graso-CoA causan alteraciones en el metabolismo de los tejidos en los que hay acumulación ectópica de ácidos grasos porque causan resistencia a insulina (Unger, 2002).

### **1.6. Estrés del retículo endoplasmático en el tejido adiposo**

El retículo endoplasmático (RE) es un sistema de endomembranas implicado en el tráfico intracelular de proteínas. Por tanto, posee una maquinaria destinada a mediar en el plegamiento de los péptidos nacientes, entre los que podemos destacar a la GRP78 (proteína relacionada con glucosa 78), GRP94 (proteína relacionada con glucosa 94), Calnexina, Calreticulina, etc (Brodsky and Skach, 2011). El estrés del RE se produce

cuando tiene lugar una acumulación de proteínas desplegadas en la luz de dicho orgánulo por encima de unos valores fisiológicos. Esta acumulación se produce como consecuencia de un gran incremento en la síntesis proteica o por una alteración en el mecanismo de plegamiento de los péptidos en la luz del RE. Cuando hay estrés en el RE se produce una respuesta denominada respuesta al despliegamiento de proteínas (UPR) y su finalidad es superar dicho estrés.

En mamíferos hay tres sensores mediante los cuales se activa la ruta UPR, el IRE1- $\alpha$  (enzima dependiente de inositol), PERK (*RNA-dependent protein kinase-like ER kinase*) y ATF6 (factor activador de la transcripción 6), estas tres proteínas de la membrana del RE en condiciones normales están unidas a GRP78 que las mantiene en su estado inactivo. Ante un aumento de péptidos desnaturizados en la luz del RE la GRP78 es secuestrada por tales péptidos y la disociación de la GRP78 de los sensores permite que éstos se activen (Bertolotti et al., 2000). La activación de PERK hace que se fosforel el eIF2- $\alpha$  (subunidad  $\alpha$  del factor 2 de iniciación de la traducción) lo cual inhibe la síntesis proteica. De esta manera se impide la entrada de nuevos péptidos nacientes en el RE (Harding et al., 2000). La activación de IRE1- $\alpha$  permite a su vez la activación de su actividad ARNasa la cual cataliza la eliminación de un intrón en un mRNA que codifica a XBP1 (proteína de unión a la caja X). Así el XBP1 se convierte en un factor de transcripción que activa la expresión de genes implicados en la UPR (Tirasophon et al., 1998). Cuando GRP78 se libera de ATF6, ésta se transloca al aparato de Golgi donde sufre una proteólisis selectiva por la proteasa del sitio 1, ésto permite la liberación de la ATF6 citosólica que migra al núcleo y activa la expresión de genes que permitirán superar el estrés en el RE (Haze et al., 1999).

El RE funciona como un sensor de nutrientes, revisado en (Mandl et al., 2009), y en condiciones de un alto aporte energético, el RE se vería saturado lo cual desencadenaría la activación de la ruta UPR. Estudios en ratones llevaron a la conclusión que en obesidad está activada la ruta de UPR (Ozcan et al., 2004). Se ha propuesto que el estrés en el RE conduce a la respuesta inflamatoria que tiene lugar en la obesidad a través de un incremento en la actividad de JNK (c-Jun N-terminal quinasa) y de una activación de NF- $\kappa$ B (Urano et al., 2000, Hu et al., 2006).

## 1.7. Estudios genómicos y proteómicos previos

### 1.7.1. Estudios de expresión de mRNA en tejido adiposo

Los estudios genómicos y proteómicos han permitido un gran adelanto en el conocimiento de las alteraciones que tienen lugar en obesidad, así como en la relación entre

ésta y las patologías asociadas. La aplicación de *microarrays* de DNA para el estudio de las alteraciones a nivel de expresión génica asociadas a la obesidad ha sido ampliamente utilizado sobre todo en modelos animales. Uno de los primeros trabajos, utilizó ratones ob/ob e identificó a la leptina como regulador de numerosos genes cuya expresión estaba controlada por el *sterol regulatory element-binding protein 1* (SREBP-1). Éste es un factor que regula la transcripción de genes del metabolismo de los lípidos, entre otros, los genes implicados en la síntesis de ácidos grasos. Por tanto, en dicho estudio se estableció una relación entre los bajos niveles de leptina de ratones obesos y una reducción en la expresión de los genes implicados en el metabolismo de los lípidos (Soukas et al., 2000). En humanos también se ha observado una disminución en la expresión de los genes implicados en lipogénesis (Dubois et al., 2006, Ortega et al., 2010). En un estudio en que se examinó la expresión génica de ratones delgados, obesos y obesos que habían desarrollado hiperglucemia a causa de la obesidad se encontró una disminución en la expresión de genes implicados en el metabolismo energético en los ratones obesos con hiperglucemia. Además se observó una disminución en la expresión de genes implicados en la diferenciación del adipocito asociada a la obesidad (Nadler et al., 2000).

Otro descubrimiento que puso de manifiesto la aplicación de *microarrays* fue el de la asociación del mRNA de la *retinol binding protein 4* (RBP4) con la resistencia a insulina. En este estudio se emplearon dos modelos murinos, en uno se sobre-expresó GLUT-4 y en el otro se anuló la expresión de dicho gen. La ausencia de GLUT-4 impedía que el tejido adiposo actuase como sumidero del exceso de energía debido a la limitación en la captación de glucosa, lo que generó un fenotipo de resistencia a la insulina, y la sobre-expresión de RBP4 (Yang et al., 2005).

Las técnicas de *microarrays* se han aplicado en numerosos estudios utilizando tejido adiposo humano, algunos se han llevado a cabo para comparar los depósitos grasa subcutáneo y omental. A continuación se describen dos de ellos. Se comparó la expresión génica de ambos depósitos en pacientes obesos de sexo masculino, sin diabetes y con niveles normales de lípidos en sangre y se encontraron diferencias de expresión en las rutas en las que intervienen los genes HOX, en la ruta Wnt y en los genes CEBPs, lo cual revelaba diferencias en la adipogénesis. También se hallaron diferencias en la expresión de factores secretados por el tejido adiposo tales como IL-6 y en genes relacionados con la actividad lipolítica de ambos depósitos (Vohl et al., 2004). En otro estudio hallaron diferencias de expresión en genes implicados en la diferenciación del adipocito (van Beek et

al., 2007) identificando mayores niveles de expresión de FABP4 (*fatty acid binding protein 4*) y CD36 en el tejido adiposo subcutáneo.

Asimismo, se han empleado *microarrays* para el estudio de la alteración inducida por la obesidad en el tejido adiposo humano. Utilizando biopsias de tejido adiposo subcutáneo se concluyó que la predisposición a sufrir obesidad estaba asociada a una reducción en la expresión de genes relacionados con el metabolismo de la glucosa, con la biosíntesis de ácidos grasos, y con rutas catabólicas propias de la mitocondria, tales como la beta-oxidación, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la cadena de transporte electrónico (Marrades et al., 2010). Recientemente dos publicaciones han estudiado cómo la obesidad afecta a la expresión génica no sólo del tejido adiposo subcutáneo sino también del omental. En el primero de ellos se emplearon tanto hombres como mujeres y entre otras conclusiones los autores destacaron que había más genes regulados en el depósito omental que en el subcutáneo, y además que en los individuos obesos las rutas lipogénicas y lipolíticas estaban reprimidas. Los autores subrayaron que podría tratarse de mecanismos para evitar la acumulación excesiva de grasa en el tejido adiposo (del Pozo et al., 2011). En otro estudio donde sólo se emplearon mujeres llegaron a la conclusión que en la progresión desde un estado de peso normal a un estado de obesidad tenía lugar una disminución coordinada de genes implicados en rutas metabólicas tales como la lipogénesis, captación de glucosa inducida por insulina, ciclo de los ácidos tricarboxílicos y cadena de transporte electrónico, y una sobre-expresión de genes implicados en respuesta inmune. Además, estos autores concluyeron que la alteración de la expresión génica causada por la obesidad era muy similar en ambos depósitos grasos (Klimcakova et al., 2011).

### **1.7.2. Estudios proteómicos en tejido adiposo humano**

El primer estudio proteómico en tejido adiposo humano fue publicado en 2004 por el grupo de la Dra. Belén Peral (Corton et al., 2004) con la identificación de proteínas en el tejido adiposo omental humano. Posteriormente, en un estudio proteómico comparativo se hallaron proteínas alteradas en dicho depósito graso en mujeres con Síndrome de Ovario Poliquístico (Corton et al., 2008). Otro grupo pionero en el análisis proteómico del tejido adiposo fue el del Dr. Julio Celis, que realizó un estudio en tejido adiposo de mama (Celis et al., 2005) e identificó proteínas con un papel importante en el desarrollo del cáncer de mama.

También se han publicado estudios proteómicos utilizando modelos de adipogénesis, lo que ha revelado numerosas proteínas implicadas en la diferenciación de los adipocitos.

Uno de estos trabajos, que empleó preadipocitos extraídos del tejido adiposo subcutáneo, destacó la inducción de proteínas pertenecientes a la familia de las HSPs (*Heat Shock Proteins*) (DeLany et al., 2005). Varios análisis proteómicos han analizado el secretoma del tejido adiposo humano. En una de las publicaciones más citadas se identificaron 70 proteínas secretadas por el depósito omental tras haber realizado cultivos de explantes de dicho tejido. Dichas proteínas estaban implicadas en procesos de regulación y señalización celular, en degradación, en el sistema inmune o bien estaban relacionadas con la matriz extracelular (Alvarez-Llamas et al., 2007). En un estudio del perfil secretor de los adipocitos diferenciados *in vitro* a partir de preadipocitos del tejido adiposo subcutáneo se investigó el perfil secretor del proceso de adipogénesis. Lo novedoso de este estudio fue el hallazgo de numerosos inhibidores de serín-proteasas (serpinas), siendo la primera vez que se observaba la implicación de esta familia de proteínas en adipogénesis (Zvonic et al., 2007). Mediante la técnica de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) también se analizó el secretoma en el proceso de adipogénesis de las células de la fracción estroma-vascular (SVF) obtenidas del tejido adiposo subcutáneo (Kim et al., 2010). Estos autores concluyeron que proteínas pertenecientes a las rutas *Wnt* y *TGF-β* podrían estar implicadas en el proceso de adipogénesis.

Más recientemente otro trabajo ha estudiado las proteínas extraídas de la SVF y de los adipocitos del tejido adiposo omental y subcutáneo de individuos no obesos, así como de biopsias de ambos depósitos grasos. Los autores concluyeron que las principales diferencias a nivel proteico entre los dos tejidos radicaban en la SVF, ya que la mayoría de las proteínas con diferencias de expresión entre ambos depósitos pertenecían a la SVF (Peinado et al., 2010). Posteriormente se publicó un estudio similar en el que se compararon las proteínas extraídas de los adipocitos y de la SVF solo del depósito subcutáneo. Dicho trabajo concluyó que las proteínas diferencialmente expresadas entre ambos tipos celulares pertenecían principalmente a las rutas de estrés oxidativo, metabolismo de lípidos, glicolisis y citoesqueleto (Kheterpal et al., 2011).

Hasta el momento sólamente se han publicado dos análisis proteómicos que indagan en las alteraciones a nivel de proteína en obesidad, y en ambos se ha utilizado solo el tejido adiposo subcutáneo. En uno de estos estudios se comparó la grasa subcutánea extraída de los muslos de individuos obesos y no obesos y se identificaron 20 proteínas con diferencias de expresión asociadas a obesidad. Diecinueve de estas proteínas estaban aumentadas en los pacientes obesos y 7 estaban relacionadas con la ruta UPR y con estrés del RE (Boden et al., 2008). En otro estudio se investigó que tras el tratamiento con rosiglitazona en

pacientes obesos, en el tejido adiposo abdominal aumentaba la expresión de proteínas del citoesqueleto responsables de la fusión de los gránulos portadores de GLUT-4 con la membrana plasmática, así como la expresión de proteínas implicadas en oxido-reducción, inflamación y señalización por calcio (Ahmed et al., 2010). En este contexto, se ha de mencionar la existencia de distintos tipos de tejido adiposo subcutáneo, según su localización en el organismo y su profundidad desde la piel, habiendo entre ellos diferencias en la vasculatura, la composición de la matriz extracelular y la anatomía celular de los adipocitos (Sbarbati et al., 2010, Lancerotto et al., 2011). Por lo tanto, la composición de proteínas del depósito subcutáneo en la región gluteo-femoral (tejido adiposo estructural) posiblemente no sea la misma que la del depósito subcutáneo abdominal (tejido adiposo de depósito).

En los últimos años se han realizado importantes descubrimientos acerca de la etiología de la obesidad, gracias no solo a los estudios epidemiológicos que incluyen a decenas de miles de individuos, sino también a los numerosos avances tecnológicos como son el desarrollo de plataformas para analizar genomas completos, secuenciadores más potentes, así como técnicas de microscopía y resonancia magnética de alta resolución, entre otras metodologías. Las plataformas proteómicas también han sido ampliamente empleadas en la última década, aunque mayoritariamente se han enfocado a estudios de adipogénesis, así como al estudio del secretoma del tejido adiposo. La mayoría de estos estudios han utilizado modelos animales, así como cultivos celulares de adipocitos. Cuando se comenzó el trabajo de esta Tesis Doctoral no existían publicaciones que hubiesen utilizado esta aproximación experimental para el estudio de la obesidad utilizando además, el tejido adiposo humano.

En este trabajo de Tesis Doctoral, aplicando herramientas proteómicas y utilizando biopsias humanas de tejido adiposo omental y subcutáneo abdominal se describe por primera vez un patrón diferencial de expresión proteica entre los dos depósitos grasos de pacientes obesos (Perez-Perez et al., 2009), así como un perfil diferencial de expresión de proteínas en el tejido adiposo omental debido a la obesidad (Perez-Perez et al., 2012a). Además, igualmente por vez primera, se ha realizado un estudio de validación de las proteínas de referencia comúnmente empleadas en los estudios de expresión proteica en el tejido adiposo humano, y se han identificado nuevas proteínas de referencia en los depósitos omental y subcutáneo para ser empleadas en futuros análisis de expresión proteica en obesidad (Perez-Perez et al., 2012b).

## 2. OBJETIVOS

La obesidad es una enfermedad multifactorial en la que intervienen tanto factores genéticos como ambientales. Estudios previos habían puesto de manifiesto la existencia de perfiles de expresión génica alterados en el tejido adiposo de pacientes con obesidad. Sin embargo, el conocimiento de proteínas implicadas en la patogénesis de la enfermedad era muy limitado. Por ello, este trabajo de Tesis Doctoral ha pretendido ahondar en el conocimiento de la expresión proteica en los dos depósitos grasos mayoritarios en humanos, el tejido adiposo visceral y el subcutáneo, así como identificar alteraciones en la expresión de proteínas de dichos depósitos que pudiesen tener relevancia en la fisiopatología de la obesidad, con los objetivos que se enumeran a continuación:

1. Identificación de proteínas expresadas diferencialmente en el tejido adiposo visceral y subcutáneo mediante análisis proteómicos comparativos.
2. Investigar algunas de las proteínas identificadas que pudiesen explicar tanto las diferencias como las similitudes existentes entre ambos tejidos.
3. Comparar los proteomas del tejido adiposo visceral en individuos obesos y no-obesos con el fin de identificar proteínas con diferencias en su patrón de expresión como consecuencia de la obesidad.
4. Estudiar la relevancia biológica de algunas de las proteínas encontradas, así como de las rutas de señalización alteradas en el tejido adiposo visceral para investigar su implicación en la fisiopatología de la obesidad.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### 3.1. Pacientes incluidos en el estudio

Todos los pacientes incluidos en este estudio fueron diagnosticados por el Dr. José Manuel Fernández-Real de la Unidad de Diabetes y Endocrino del Hospital Dr. Josep Trueta de Girona quien nos ha proporcionado las muestras de tejido adiposo para los estudios. Las características fenotípicas de estos pacientes separados por género se detallan en la tabla 3. Las biopsias se tomaron durante la cirugía siempre de la misma localización anatómica, el tejido adiposo omental se obtuvo del “omentum majus” y el tejido adiposo subcutáneo se obtuvo del área abdominal. Tras la obtención, las biopsias se lavaron con una solución de cloruro sódico al 0,9 % enfriada a 4 °C, a continuación la biopsia se fragmentó en piezas, éstas se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta la extracción de proteínas. Se obtuvo un consentimiento informado de todos los individuos y el protocolo fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Dr. Josep Trueta de Girona. Los individuos incluidos en el estudio no cumplieron ninguno de los siguientes criterios de exclusión: 1) sufrir una enfermedad sistémica o maligna, 2) presentar adicciones de tabaquismo, alcoholismo o drogadicción, 3) tener concentraciones elevadas de creatinina en suero, 4) haber padecido un accidente cardiovascular agudo en los últimos seis meses, 5) sufrir enfermedad aguda o crónica inflamatoria o bien enfermedad infecciosa, 6) retraso mental del paciente.

La resistencia a insulina en estado de ayunas se estimó con los niveles de glucosa e insulina utilizando el índice de resistencia a insulina (Bastard et al., 1997) y el índice HOMA-IR (Matthews et al., 1985). El grado de obesidad se determinó por el índice de masa corporal (IMC), definido como el peso en kilogramos dividido por el cuadrado de la altura en metros.

### 3.2. Técnicas de separación e identificación de proteínas

En este trabajo de Tesis Doctoral se han aplicado técnicas de proteómica para encontrar diferencias de expresión proteica entre el tejido adiposo omental y el subcutáneo y entre individuos con distinto IMC. El procedimiento a seguir ha sido el siguiente: i) extracción de las proteínas del tejido adiposo, ii) separación de las proteínas e iii) identificación de proteínas diferencialmente expresadas. Como método de separación se eligió la electroforesis bidimensional que separa a las proteínas en función de su carga eléctrica y de su masa molecular. Para la identificación de las proteínas se empleó la técnica de espectrometría de masas (MS) *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flyght* (MALDI-TOF).

**Tabla 3: Características de los pacientes incluidos en esta Tesis Doctoral.**

	No-Obesos	Obesos	Obesos & DM-2	P (ANOVA)
n (Mujeres)	15	15	15	
Edad (años)	45 ± 11	47 ± 7	48 ± 12	0,801
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	<b>26,1 ± 2,6</b>	<b>43,2 ± 5,3</b>	<b>44 ± 4</b>	<b>&lt;0,0001</b>
% grasa	36,3 ± 4,5	57,2 ± 7,3	58,5 ± 5,9	<0,0001
Cintura (cm)	86,2 ± 5,1	110,8 ± 15,8	122 ± 20,1	0,016
Cadera (cm)	97,4 ± 5,6	151 ± 19,8	127 ± 16,3	0,004
<b>Cintura/Cadera</b>	<b>0,89 ± 0,03</b>	<b>0,79 ± 0,02</b>	<b>0,96 ± 0,08</b>	<b>0,013</b>
glucosa en sangre (mg/dL)	87,2 ± 13,3	95,1 ± 14,8	167 ± 54,9	<0,0001
<b>HbA<sub>1c</sub></b>	<b>4,65 ± 0,76</b>	<b>4,93 ± 0,31</b>	<b>6,73 ± 1,98</b>	<b>0,015</b>
colesterol total (mg/dL)	201,6 ± 35,7	198,1 ± 31,3	198,3 ± 35,1	0,968
HDL-colesterol (mg/dL)	80,5 ± 27,3	59,2 ± 14,4	53,4 ± 9,5	0,309
LDL-colesterol (mg/dL)	97,4 ± 43,2	113,1 ± 15,6	121,4 ± 34,2	0,295
Triglicericidos (mg/dL)	123,9 ± 71,9	118,6 ± 54,3	135,7 ± 41,1	0,77
<b>SBP (mmHg)</b>	<b>125,4 ± 15,7</b>	<b>143,6 ± 9,9</b>	<b>152,2 ± 27,3</b>	<b>0,023</b>
DBP (mmHg)	72,8 ± 11,8	86,2 ± 8	82,6 ± 8,1	0,053
	Obesos	Obesos & DM-2	P (t-Student)	
n (Hombres)	16	6		
Edad (años)	41 ± 8	42 ± 7	0,73	
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	44,4 ± 8	45 ± 4,6	0,682	
% grasa	46,4 ± 8,9	47,4 ± 4,3	0,599	
Cintura (cm)	141,8 ± 9,4	140 ± 4,2	0,819	
Cadera (cm)	143 ± 26,9	134,5 ± 9,2	0,713	
Cintura/Cadera	1,01 ± 0,1	1,04 ± 0,04	0,687	
glucosa en sangre (mg/dL)	<b>103,5 ± 49,4</b>	<b>158,3 ± 94,7</b>	<b>0,002</b>	
HbA <sub>1c</sub>	4,86 ± 0,52	5,07 ± 0,4	0,531	
colesterol total (mg/dL)	175,5 ± 30	185,2 ± 31,1	0,343	
HDL-colesterol (mg/dL)	50,9 ± 20,2	43 ± 13,5	0,681	
LDL-colesterol (mg/dL)	94,2 ± 23,1	95,6 ± 45,9	0,118	
<b>Triglicericidos (mg/dL)</b>	<b>130 ± 93,1</b>	<b>239,8 ± 216,1</b>	<b>0,013</b>	
SBP (mmHg)	137 ± 18,2	142,3 ± 19,7	0,967	
DBP (mmHg)	84,7 ± 8,6	85,8 ± 20,8	0,724	

Se han considerado no obesos a los individuos con IMC<30 kg/m<sup>2</sup> y obesos a los individuos con IMC>30 kg/m<sup>2</sup>. HbA<sub>1c</sub> hemoglobina glicada, SBP: presión sistólica, DBP: presión diastólica. En negrita se muestran los parámetros cuyas medias son diferentes con significación estadística entre distintos grupos de pacientes.

### 3.2.1. Preparación de las muestras para la electroforesis bidimensional

Se extrajeron las proteínas a partir de unos 100 mg de tejido adiposo humano utilizando el kit *Sample Grinding* (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido). El tejido todavía congelado se sumergió en tampón de lisis (urea 7 M; tiourea 2 M; CHAPS 4% (p/v); Tris-HCl 30 mM pH 8,5; DTT 50 mM) y se añadió un coctel de inhibidores de proteasas (Protease Inhibitor, GE Healthcare). El homogenado resultante se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora y se centrifugó durante 30 minutos a 13000 rpm. Las impurezas que podrían interferir con la electroforesis bidimensional (2D) se eliminaron mediante el kit *2D Clean Up* (GE Healthcare), este kit generaba un pellet de proteínas que se resuspendió en tampón de lisis. La concentración de proteína se determinó mediante el kit *RC/DC Protein Assay* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

### 3.2.2. Electroforesis Bidimensional Convencional

Se emplearon 100 µg de extracto proteico para cada ensayo de electroforesis bidimensional, éstos se diluyeron en tampón de lisis y 0,8% (v/v) de tampón IPG (*Immobilized pH Gradient*) 3-10 (Pharmalytes GE Healthcare). El isoelectroenfoque (IEF) de las proteínas se realizó en tiras individuales de acrilamida de gradiente de pH inmovilizado (IPG, Immobiline DryStrips, GE Healthcare) con el sistema IPGPhor (GE Healthcare), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. El programa de IEF fue el siguiente: paso 1: 30 V 6 h, paso 2: 60 V 6h, paso 3: 120 V 1 h, paso 4: 200 V 1 h, paso 5: 500 V 1 h, paso 6: 1000 V 1 h, paso 7: desde 1000 hasta 8000 V 1 h 30 min, paso 8: 8000 V 1 h. Se utilizaron tiras de gradiente de pH 4-7 de 18 cm de longitud. Con el fin de resolubilizar las proteínas y reducir los puentes disulfuro tras el IEF, las tiras IPG se equilibraron durante 15 min en un tampón de equilibrado (urea 6 M; glicerol 30% (v/v); Tris-HCl 50 mM pH 8,8; SDS 4% (p/v); trazas de azul de bromofenol) suplementado con 10 mg/ml de DTT. Seguidamente, las tiras IPG se equilibraron 15 min en el mismo tipo de tampón de equilibrado suplementado con 25 mg/ml de iodoacetamida, para prevenir la reoxidación de los grupos tiol durante la electroforesis.

La segunda dimensión se realizó en un sistema Protean II XL (Bio-Rad Laboratories) utilizando geles de poliacrilamida al 12% con SDS mediante los protocolos habituales. Los geles se tiñeron con plata con el kit *PlusOne Silver Staining* (GE Healthcare) que se modificó para hacerlo compatible con la MS: para ello se eliminó el glutaraldehído en la solución de sensibilizado y el formaldehido en la solución de nitrato de plata (Shevchenko et al., 1996).

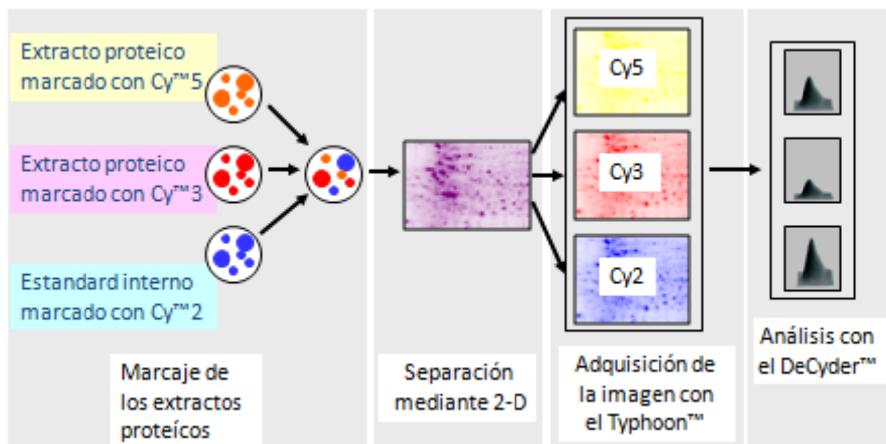
Las imágenes se digitalizaron a una resolución de 300 puntos por pulgada con un densitómetro específico para geles 2D (GS-800 Calibrated Densitometer, Biorad) y con el programa PD-Quest versión 7.1 (Bio-Rad).

### 3.2.3. Protocolo 2D-DIGE

Esta técnica se caracteriza por el marcaje de las proteínas previamente a su separación, y por el empleo de un estándar interno constituido por la mezcla equimolecular de todas las muestras a analizar. Este patrón interno se analiza en cada uno de los geles del experimento junto con muestras de los dos tipos fenotípicos a comparar (figura 2). Las muestras se marcaron con tres tipos diferentes de fluorocromos en función de sus espectros de excitación y emisión (488/520 nm) *Cy2*, (532/580 nm) *Cy3*, y (633/670) *Cy5* (*CyDye™ DIGE Dyes*, GE Healthcare), según las instrucciones del fabricante, en condiciones de marcaje mínimo: 400 pmol de fluorocromo para cada 50 µg de proteína. Estos fluorocromos presentan un grupo éster NHS reactivo diseñado para producir una unión covalente al grupo amino  $\gamma$  de los residuos de lisina. En estas condiciones se marcan únicamente el 3% las de proteínas presentes y sólo en una única lisina por molécula de proteína (Alban et al., 2003). Tras 30 min de incubación en hielo y en oscuridad, se paró la reacción de marcaje con lisina 10 mM.

El IEF se realizó en tiras IPG de 24 cm de longitud y rango de pH 3-11 no lineal (NL). Después de hidratar las tiras en 450 µl del tampón de hidratación (Urea 7 M, Tiourea, 2 M, CHAPS 2% (p/v), Tris-HCl 40 mM) con 1,2% de hidroxietildisulfuro (HED) y 0,7% de tampón IPG pH 3-11 (Pharmalytes GE Healthcare), la muestra se cargó mediante el procedimiento de *cup-loading*. En cada gel se analizaron 150 µg de proteína (50 µg de proteína de la condición 1, 50 µg de proteína de la condición 2 y 50 µg de proteína del estándar interno) en un volumen final de 100 µl de solución de hidratación complementado con 2 mg/ml DTT y 0,7 % (v/v) de tampón IPG pH 3-11. El programa de IEF fue: 300 V 3h, desde 300 hasta 1000 V en gradiente 4 h, desde 1000 hasta 8000 V en gradiente 2h y desde 8000 V hasta alcanzar los 40000 V/h totales.

La separación en geles SDS-PAGE al 12% se realizó en el sistema de electroforesis Ettan Dalt Six (GE Healthcare) a 25 °C hasta que el frente de electroforesis alcanzó el extremo inferior del gel. Los geles se escanearon con escáner Typhoon 9400 (GE



**Figura 2: Esquema de la secuencia de acciones que se llevan a cabo en un experimento 2D-DIGE.** En primer lugar se realiza el marcado de los extractos proteicos con los fluorocromos, se separan las proteínas mediante la 2D, se escanean las imágenes que genera cada uno de los fluorocromos, se realiza el análisis de la imagen y se procede al análisis estadístico para determinar las manchas que aparecen con diferente señal entre las dos condiciones del estudio.

Healthcare) a una resolución de 100  $\mu\text{m}$ , usando las longitudes de excitación/emisión adecuadas para los fluorocromos Cy2, Cy3 y Cy5. El análisis de las imágenes de fluorescencia se realizó mediante el paquete informático DeCyder versión 7 (GE Healthcare). En primer lugar se empleó el módulo DIA (DeCyder Differential In Gel Analysis) para detectar las imágenes que generaron los 3 fluorocromos y para seleccionar las manchas que coincidieron en las 3 imágenes en cada uno de los geles. A continuación se normalizó la señal de cada uno de los dos grupos de muestras que participan en el estudio usando la señal correspondiente al estándar interno (Cy3/Cy2 para el grupo 1, Cy5/Cy2 para el grupo 2). Con el módulo BVA (*DeCyder Biological Variation Analysis*) se emplearon las imágenes de cada uno de los estándares internos procesadas con el módulo DIA para comparar la abundancia relativa en la señal de las manchas entre todos los geles mediante la ecuación:

$$\text{Abundancia relativa} = \text{Vol normalizado grupo 1} / \text{Vol normalizado grupo 2}$$

Después se llevó a cabo el análisis estadístico para determinar los cambios de expresión proteica. Se consideraron estadísticamente significativos los p-valores menores de 0,05 calculados mediante el test de la t de Student.

El marcaje fluorescente de las muestras y la preparación de los geles correspondientes se realizaron en colaboración con la Unidad de Proteómica del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC).

### 3.2.4. Identificación de proteínas por espectrometría de masas

La identificación de proteínas con diferente expresión entre las dos condiciones estudiadas constó de varios pasos, incluyendo la digestión *in situ* de las proteínas, la extracción de los péptidos resultantes y la determinación de las masas peptídicas mediante MALDI-TOF. Por último, se empleó una estrategia de identificación mediante huella peptídica, en la que los espectros de masas obtenidos por MALDI-TOF permiten la identificación de las proteínas utilizando programas de búsqueda que comparan la información experimental con la existente en las bases de datos. Las manchas de proteína fueron recortadas manualmente y digeridas con tripsina de forma automática en un robot digestor *Proteineer DP* (Bruker-Daltonics, Bremen, Alemania). Se empleó el protocolo de digestión de Shevchenko (Shevchenko et al., 2006), con ligeras variaciones. El análisis de la muestra se llevó a cabo en un espectrómetro de masas Ultraflex MALDI TOF/TOF (Bruker-Daltonics).

Los espectros de masas fueron obtenidos en el Servicio de Proteómica del CNIC. La búsqueda de las masas peptídicas se llevó a cabo con el programa informático MASCOT (Matrix Science, London, UK; <http://www.matrixscience.com>) utilizando la base de datos Swiss-Prot (Swiss Institute of Bioinformatics (SIB); Ginebra, Suiza). Este programa proporciona una lista priorizada que incluye aquellas proteínas que presentan mayor probabilidad de corresponderse con la proteína analizada en función de su huella peptídica.

### 3.2.5. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

Los inmunoprecipitados se digirieron con tripsina porcina modificada a una concentración de 25 mg/l en NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 100 mM y se dejó transcurrir la digestión durante 16 h a 37 °C. La mezcla de péptidos trípticos proveniente de la digestión fue llevada a sequedad mediante centrifugación en vacío y se reconstituyó en ácido acético al 1% (v/v). Los péptidos se sometieron a cromatografía en un gradiente continuo de acetonitrilo en una nano-columna de fase reversa C-18 (Mediterranea Sea, Teknokroma, Barcelona, España) de 100 mm de diámetro interno y 15 cm de longitud. El gradiente se desarrolló de 0% a 43% de solución B (95% de acetonitrilo y 0,5% de ácido acético) en 140 min y de 50% a 90% de solución B en 1 min. Se aplicó un flujo de 300 nl/min para eluir los péptidos de la nanocolumna e introducirlos en una aguja de nanoelectronebulización (New Objective, Woburn, Massachusetts, USA) para su ionización y fragmentación en línea en un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap XL (Thermo Fisher, San José, CA, USA). Los espectros se analizaron utilizando los programas SEQUEST (versión 1.0.43.2, Thermo

Fisher Scientific) y Mascot (versión 2.1, matrixscience). SEQUEST se configuró para buscar en la base de datos de proteínas de Human Fasta (versión 1,0, 199.762 entradas) y Mascot para las búsquedas en Swiss-Prot (versión 51,6, 236.102 entradas). Para validar las identificaciones de péptidos y de proteínas del análisis de MS se utilizó el software Scaffold v.3.00.02 (Proteome Software Inc, Portland, USA). Se dieron por buenas las identificaciones de péptidos si su probabilidad era mayor del 95%, y las identificaciones de las proteínas si su probabilidad era mayor del 95% y además si había dos péptidos identificados por proteína. Para el cálculo de las diferencias en la abundancia de proteínas, sobre la base de las cuentas espectrales proporcionadas por el software Scaffold, se consideró una distribución beta binomial, de acuerdo a la cual se testó la significación estadística de dichas diferencias (Pham et al., 2010). Los ratios de diferencias de niveles se calcularon tras la normalización por cuantiles de las cuentas espectrales no ponderadas (Clough et al., 2011). Se consideraron significativas las diferencias con  $p < 0,05$ .

### **3.3. Inmunoensayos**

#### **3.3.1. Western-Blot**

Para la detección de proteínas mediante Western-Blot (WB), se homogeneizó una biopsia de tejido adiposo en tampón RIPA (radioimmuno precipitation assay) que se componía de 0,1% SDS, 0,5% sodium deoxycholate, 1% Nonidet P-40, 150 mM NaCl y 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 y al que se le añadió una mezcla de inhibidores de proteasas (Protease Inhibitor, GE Healthcare). Para la homogenización se empleó el kit Sample Grinding Kit (GE Healthcare) y se empleó tal como indica el fabricante. Los restos celulares y los lípidos se eliminaron mediante centrifugación a 13000 rpm durante 1 h a 4°C. Se recuperó la fracción intermedia entre la parte superior compuesta por lípidos y el pellet constituido por fragmentos celulares que no se diluyeron en el tampón RIPA. La concentración de proteína se determinó mediante el kit BCA Protein Assay (Pierce, Rockford, IL).

Dependiendo de si la proteína a detectar fuera más o menos abundante en el extracto proteico y de su masa molecular, se cargaron entre 5 y 20 ug de proteínas en geles SDS-PAGE de entre el 7 y el 14%. En la transferencia se emplearon membranas de nitrocelulosa Hybond ECL y se realizó mediante los métodos convencionales. Tras la transferencia las membranas se tiñeron con rojo Ponceau (Sigma) al 0,15% para asegurarnos de que se había cargado la misma cantidad de proteína en todos los carriles. A continuación, las membranas se bloquearon con 5% (p/v) de BSA o bien leche desnatada

en tampón TBS con 0,1% de Tween 20. El anticuerpo primario se incubó con la membrana durante toda la noche a 4 °C, los anticuerpos empleados en este estudio y sus diluciones se muestran en la tabla 4. La incubación del anticuerpo secundario se realizó a temperatura ambiente durante 1 hora.

**Tabla 4: Anticuerpos empleados en los WB de esta Tesis Doctoral.**

Anticuerpo	Dilución	Casa comercial
<i>Mouse anti-human CK-8/18</i>	1:2000	Novocastra Laboratories
<i>Mouse anti-human HSP90</i>	1:2000	Santa Cruz Biotechnology
<i>Goat anti-human HSP27</i>	1:200	Santa Cruz Biotechnology
<i>Mouse anti-human HSP70</i>	1:1000	Stressgen BioReagents
<i>Goat anti human GRP78</i>	1:200	Santa Cruz Biotechnology
<i>Goat anti-human FABP5</i>	1:200	Santa Cruz Biotechnology
<i>Rabbit anti human FABP4</i>	1:2000	Eurogentec
<i>Mouse anti-human GAPDH</i>	1:4000	Ambion
<i>Goat anti-human B-actin</i>	1:2000	Santa Cruz Biotechnology
<i>Mouse anti human TBB5</i>	1:5000	Santa Cruz Biotechnology
<i>Rabbit anti human CALX</i>	1:5000	Santa Cruz Biotechnology
<i>Rabbit anti human ENOA</i>	1:10000	Santa Cruz Biotechnology
<i>Goat anti-human PARK7</i>	1:200	Santa Cruz Biotechnology
<i>Goat anti human PGK1</i>	1:500	Santa Cruz Biotechnology
<i>Goat anti human FAA</i>	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
<i>Rabbit anti human TKT</i>	1:2000	Sigmaaldrich
<i>Rabbit anti human ACY-1</i>	1:2000	Sigmaaldrich

### 3.3.2 Inmunohistoquímica

La muestra de tejido adiposo se fijó en formaldehido al 10% y se procesó para su inclusión en parafina. Los cortes de 5 µm de grosor se realizaron utilizando un microtomo. Las secciones de tejido adiposo se desparafinaron y se hidrataron antes de proceder al desenmascaramiento antígenico, que se realizó mediante calor en tampón EDTA 1mM a pH 8,2. Las secciones de tejido se bloquearon con 5% de suero en PBS y se incubaron en cámara húmeda toda la noche o bien 1 hora con el anticuerpo primario. A continuación se procedió a incubar con el anticuerpo secundario del kit VECTASTAIN ABC (Vector laboratories, Inc Burlingame, CA), y la visualización se realizó con diaminobencidina (DAB, Vector Laboratories, Inc.). Se usó la hematoxilina como tinción de contraste y se

procedió a montar la muestra con Entellan (Merk, Darmstadt, Alemania). Se empleó un microscopio Nikon Eclipse 90i para observar las tinciones. Como control negativo se llevó a cabo el mismo proceso, pero sin utilizar el anticuerpo primario.

### 3.3.3. Inmunofluorescencia

Las secciones de tejido adiposo congelado o bien las células se fijaron con paraformaldehido al 4% y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,1% en PBS para permitir la entrada del anticuerpo al interior de la célula. Las muestras se bloquearon con 5% de suero en PBS. La incubación con anticuerpo primario fue a 4 °C en cámara húmeda durante toda la noche y después se incubó durante una hora con un anticuerpo secundario Alexa Fluor (Molecular Probes Inc., OR, USA), a temperatura ambiente. Los cortes de tejido adiposo y las células se tiñeron con DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) para mostrar los núcleos. También se empleó la tinción con BODIPY 493/503 (Molecular Probes Inc.), para observar las gotas lipídicas en cultivo de adipocitos. Para la visualización de las muestras se usó un microscopio confocal Espectra Leica TCS SP5 (Heidelberg, Alemania). Como control negativo se llevó a cabo un proceso similar pero sin anticuerpo primario. En la tabla 5 se muestran los anticuerpos junto con las diluciones que se emplearon tanto en inmunohistoquímica como en inmunofluorescencia.

**Tabla 5: Anticuerpos empleados en las inmunohistoquímicas e inmunofluorescencias de esta Tesis Doctoral.**

Anticuerpo	Dilución	Casa comercial
<i>Mouse anti-human CK-18</i>	1:50	Progen Biotechnik
<i>Goat anti-human FABP5</i>	1:100	Santa Cruz Biotechnology
<i>Rabbit anti-human TKT</i>	1:500	Sigma Aldrich
<i>Rabbit anti-human ACY-1</i>	1:500	Sigma Aldrich
<i>Mouse anti-human CD68</i>	1:50	Santa Cruz Biotechnology

### 3.3.4. Inmunoprecipitación

Para la inmunoprecipitación empleamos el kit *Direct IP* (Pierce, Thermo Fisher Scientific Inc.). Por cada reacción de inmunoprecipitación se empleó 1 ug de anticuerpo anti-HA (Roche) y un mg de proteína. La hibridación se realizó a 4°C durante toda la noche. Los lavados del inmunoprecipitado se llevaron a cabo según recomendaciones del fabricante y adicionalmente se hicieron otros 10 lavados con 200 µl de bicarbonato amónico 50 mM para permitir la compatibilidad con el análisis de cromatografía líquida

acoplada a espectrometría de masas. Tras los lavados el inmunoprecipitado se guardó a -20°C en bicarbonato amónico. Como control negativo se empleó extracto proteico de células HeLa o HEK-293 que fueron transfectadas con el plásmido pcDNA3/HA. Se llevaron a cabo 4 réplicas para cada una de las dos líneas celulares.

### **3.4. Tratamiento de los fibroblastos 3T3-L1 para inducir adipogénesis.**

Los fibroblastos de ratón 3T3-L1 (CCL 92.1, *American Type Culture Collection*) se crecieron en medio DMEM (Gibco, Invitrogen Corporation Carlsbad, CA, USA) suplementado con 10% de suero de ternera a una temperatura de 37 °C y con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Se sembraron a una confluencia de 2500 células/cm<sup>2</sup> y se crecieron hasta alcanzar una confluencia del 100%. Dos días después de que hubiesen llegado a la confluencia, día 0 de diferenciación, se añadió el medio de diferenciación 1. Ese medio contenía: DMEM, 10% de suero fetal bovino, 1% HEPES pH 7,4, 1% penicilina-estreptomicina, 5µg/ml insulina humana, 0,25µM dexametasona y 0,5mM isobutilmetilxantina. Dos días después de haber añadido el medio de diferenciación 1 (día 2), éste fue retirado y se añadió el medio de diferenciación 2 que contenía: DMEM, 10% de suero fetal bovino, 1% HEPES pH 7,4, 1% penicilina-estreptomicina, 5µg/ml insulina humana. Pasados tres días desde que se añadiese el medio de diferenciación 2 (día 5), éste se retiró y se añadió medio de diferenciación 3 que contenía: DMEM, 10% de suero fetal bovino, 1% HEPES pH 7,4 y 1% penicilina-estreptomicina. Este medio se utilizó hasta completarse la diferenciación. Generalmente a partir de día 9 de diferenciación los adipocitos están diferenciados, pudiendo apreciarse diversas gotas lipídicas en su citoplasma.

### **3.5. Cultivo de células THP1 e inducción de la diferenciación.**

Las células THP1 (ATCC number TIB-202) crecieron en medio RPMI-1640 (Invitrogen Corporation Carlsbad, CA, USA) al que se añadió: 10% de suero fetal bovino, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml estreptomicina, 20 mM de tampón HEPES y 4 mM de L-glutamina. Se sembraron a una confluencia de 4x10<sup>5</sup> células/ml y se crecieron a 37°C con una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. Cada 2 días se cambió el medio. Para diferenciar las células THP1, se sembraron a 4x10<sup>5</sup> células/ml en medio que contenía 100 nM de PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*) (Sigma-Aldrich 3050 Spruce St., St. Louis, Missouri, USA) durante 24 horas. El tratamiento con PMA hace que las células se adhieran al sustrato y

consigan un fenotipo similar a macrófagos. Dos días después de retirar el medio con PMA se procedió a lisar las células.

### **3.6. Construcción de la proteína recombinante transketolasa-HA (TKT-HA)**

Disponíamos en el laboratorio de un plásmido pCMV6-AC-GFP (Origene, Rockville, USA.) que contenía el marco abierto de lectura (ORF) del cDNA de la transketolasa (TKT) en fase con la tGFP, clonado entre las dianas de restricción EcoRI y NotI. El laboratorio del Doctor Miguel Quintanilla nos cedió el plásmido pcDNA3 que contenía la secuencia codificante del antígeno HA en el sitio de clonaje múltiple de dicho plásmido (pcDNA3/HA). Mediante la digestión doble con EcoRI y NotI se subclonó el cDNA de la TKT en el plásmido pcDNA3/HA y se comprobó por secuenciación que se mantenía la pauta de lectura entre el cDNA de la TKT y el antígeno HA. Este nuevo plásmido, pcDNA3/TKT/HA, se utilizó posteriormente para transfectar las células HeLa y HEK-293.

### **3.7. Cultivo y transfección de células HeLa y HEK-293**

Las células HeLa y HEK-293 se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% HEPES pH 7,4 y 1% penicilina-estreptomicina, a una temperatura de 37°C y con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Cuando el cultivo alcanzó una confluencia del 80% se procedió a la transfección con los plásmidos pcDNA3/TKT/HA y pcDNA3/HA. Las células HeLa se transfecaron con Fugene HD (Roche Diagnostic Hague Road Indianapolis, USA) y las células HEK-293 se transfecaron con lipofectamina (Invitrogen). La mezcla de transfección que mejor resultado nos dio tenía una relación lipocomplejo/DNA de 3/1, de manera que por cada µg de DNA se añadían 3 µl de Fugene o lipofectamina dependiendo de las células a transfectar. La mezcla de transfección se mantuvo en el cultivo durante 15 horas pasadas las cuales se procedió a lisar las células.

### **3.8. Herramientas bio-informáticas**

#### **3.8.1. Análisis de interacciones con el Ingenuity Pathways Analysis (IPA)**

Para el análisis “*in silico*” de las proteínas identificadas en el estudio proteómico se empleó la aplicación Ingenuity Pathways Analysis (IPA) que analiza los posibles cambios en el metabolismo celular en función de las proteínas identificadas en un estudio masivo. La aplicación IPA funciona generando redes que abarcan a una o a varias rutas metabólicas en las que están incluidas las proteínas que se han obtenido en el estudio y las relaciona entre

sí, con otras proteínas, con hormonas, con drogas, etc. Estas relaciones se establecen siempre en base a la literatura científica y pueden ser directas o indirectas. Son relaciones directas si se ha descrito una relación inmediata entre ambas moléculas y no existe una tercera molécula mediadora de tal relación y son indirectas si se ha descrito una relación entre las dos moléculas mediada por una tercera. Las redes generadas por la aplicación IPA tienen un máximo de 35 miembros y están enriquecidas en el conjunto de proteínas que se introducen en la aplicación. Para potenciar los efectos analíticos de la interpretación de los datos las redes de proteínas se jerarquizan de acuerdo a un *score* calculado a partir de un test de Fisher (right-tailed Fisher's exact test). El *score* que genera el test de Fisher tiene en cuenta el tamaño original del conjunto de proteínas que se introducen en la aplicación así como el tamaño de la red generada, dicho valor indica cómo de relevante es la red dentro del análisis. Hay que resaltar que el *score* no indica la relevancia biológica o la calidad de la red sino que simplemente suministra un indicador con el cual empezar un examen de las rutas metabólicas incluidas en las redes de proteínas.

### 3.8.2. Clasificación funcional de las proteínas mediante el PANTHER

Para comprender la relevancia biológica, de manera global, de los cambios de expresión en las proteínas identificadas en el estudio proteómico empleamos la aplicación PANTHER (Protein Analysis Through Evolutionary Relationship, <http://www.pantherdb.org/>). La aplicación PANTHER clasifica o bien a un grupo de genes o bien a un grupo de proteínas dentro de los grupos ontológicos a los que pertenecen sobre la base de datos del Gene Ontology (GO) (<http://www.geneontology.org/>). Las proteínas son agrupadas por el PANTHER en términos de GO en función del **Proceso Biológico** en el que intervienen, en función de la **Función Molecular** que desempeñan, o bien en función del **Componente Celular** en donde está descrito que se localiza la proteína. Para realizar las comparaciones entre los términos de GO representados en las listas de proteínas identificadas en el estudio proteómico y los términos de GO representados en los 19911 genes que se traducen a proteína, el PANTHER aplica el test estadístico binomial de Cho & Campbell (Cho and Campbell, 2000), de esta manera determina los términos representados en exceso y los representados por defecto. El conjunto de 19911 genes traducibles que en el momento de hacer el experimento estaban descritos en humanos establece el número de proteínas esperado para cada término de GO. Si para un determinado término de GO el número de proteínas identificadas en el estudio es mayor que el esperado entonces dicho término de GO está sobre-representado, si el

número de proteínas es menor que el esperado entonces dicho término está bajo-representado. La aplicación del test estadístico binomial de Cho & Campbell establece si tiene significación estadística la sobre-representación o la bajo-representación de cada término del GO respecto de la representación que habría que esperar..

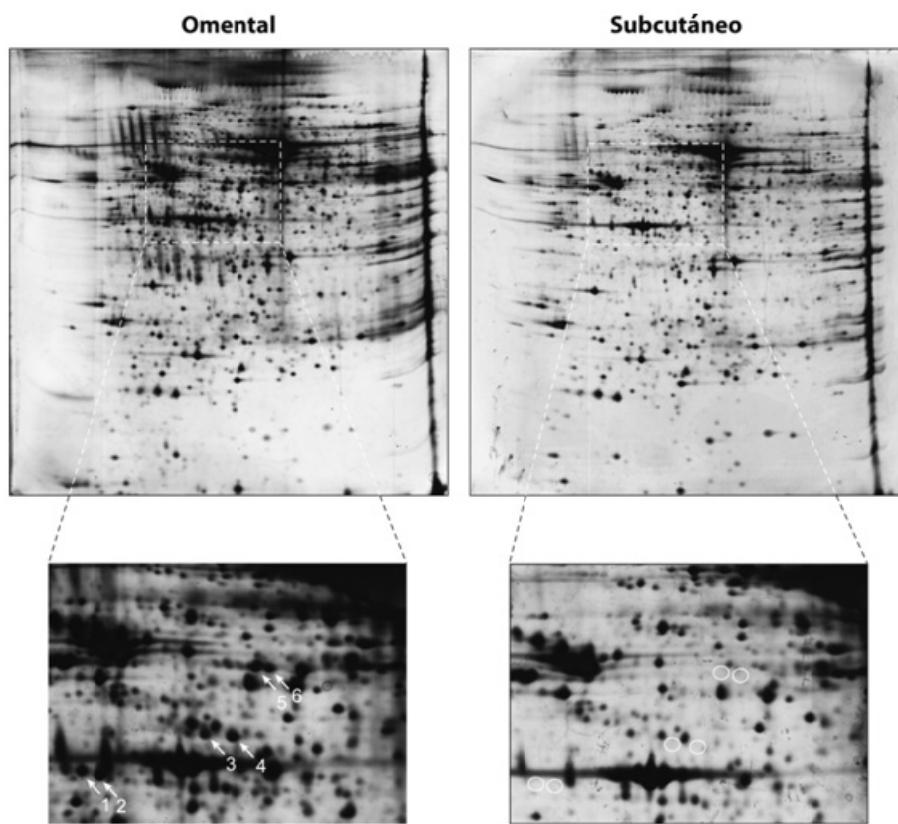
## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### **4.1. Estudio proteómico comparativo entre el tejido adiposo omental y subcutáneo**

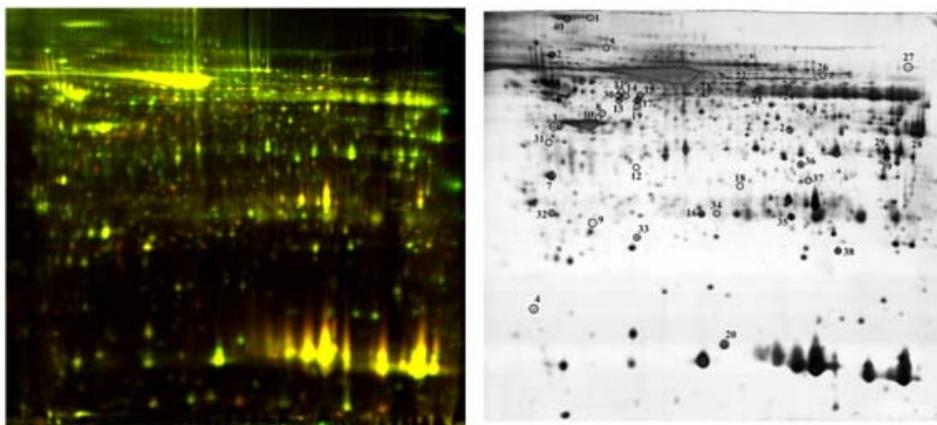
Entre las numerosas diferencias existentes entre el tejido adiposo visceral y subcutáneo destacamos que la acumulación de grasa en el tejido adiposo visceral está asociada al desarrollo de desórdenes metabólicos (Montague and O'Rahilly, 2000). La acumulación de grasa en el tejido adiposo subcutáneo, sin embargo, no lleva asociada una prognosis tan perjudicial (Snijder et al., 2003). Por tanto, las diferencias existentes entre el tejido adiposo visceral y subcutáneo podrían ser responsables, al menos en parte, de dicho comportamiento diferencial. Con esta premisa se han llevado a cabo estudios mediante *microarrays* para investigar las diferencias a nivel de expresión génica (Vohl et al., 2004) (Linder et al., 2004), sin embargo, no se han llevado a cabo estudios masivos a nivel de proteína. En vista de ello planteamos un estudio proteómico comparativo entre el tejido adiposo subcutáneo y el omental, en representación este último del depósito visceral. En primer lugar se extrajeron las proteínas de los depósitos grasos omental y subcutáneo de 15 pacientes masculinos obesos y se llevó a cabo una electroforesis bidimensional (2D) convencional con tiras de 18 cm de IPG (*Immobilized pH Gradient*) con un gradiente de pH 4-7. Los geles se tiñeron con plata y se evaluó la calidad de los proteomas para saber si había degradación en alguna muestra. Cuando visualizamos los proteomas, independientemente de que correspondieran al depósito omental o al subcutáneo, observamos que excepto dos geles, el resto presentó un patrón de manchas muy similar. Al comparar en detalle los pares de proteomas de tejido adiposo omental y subcutáneo observamos la existencia de 6 manchas que siempre aparecían en el tejido adiposo omental y nunca en el subcutáneo (figura 3). Este patrón fue reproducible en todos los pares de tejidos que se estudiaron. Se extrajeron las 6 manchas y se analizaron por espectrometría de masas (MS) MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight*) para su identificación. Las seis manchas se correspondieron con las proteínas: citoqueratina 7 (CK-7), citoqueratina 8 (CK-8), citoqueratina 18 (CK-18) y citoqueratina 19 (CK-19).

Después del estudio detallado de 15 pares de proteomas del tejido adiposo omental y subcutáneo seleccionamos un grupo de 4 individuos con un fenotipo similar en cuanto al índice de masa corporal (IMC) (comprendido entre 30,00 y 36,82 kg/m<sup>2</sup>) y en cuanto a la ausencia de enfermedades asociadas a obesidad, además sus proteomas estaban bien definidos. Con el grupo de 4 individuos citado anteriormente, se empleó la tecnología 2D-DIGE (*Differential in Gel Electrophoresis*) para llevar a cabo una comparación de los niveles de proteínas entre los 4 pares de muestras de tejido adiposo omental y subcutáneo, esta

técnica confirmó los resultados obtenidos en el estudio proteómico convencional. El 2D-DIGE es una técnica que permite disminuir la variación experimental de la electroforesis bidimensional. Esta técnica se basa en el marcaje diferencial de los extractos proteicos previamente a su separación en la electroforesis bidimensional. En el 2D-DIGE en cada gel se analizan dos de las muestras a comparar más un estándar interno formado por una mezcla equimolecular de todas las muestras a analizar que permite la normalización de las señales de fluorescencia que generan las dos muestras que se están comparando (Alban et al., 2003). Cada par de muestras se incubó con los fluorocromos Cy3 y Cy5 de manera independiente, y el estándar interno se incubó con Cy2. Los tres extractos se mezclaron y se sometieron a una separación por electroforesis bidimensional usando un gradiente de pH 3-11 NL. Los geles se escanearon con el escáner Typhoon, así se obtuvieron las imágenes de cada uno de los tres fluorocromos por separado. El software DeCyder detectó aproximadamente 2500 manchas en cada uno de los 4 geles. Estas manchas se



**Figura 3: Geles bidimensionales teñidos con plata, realizados en un rango de pH de 4-7.** A la izquierda se presenta el gel correspondiente al tejido adiposo omental y a la derecha el del tejido adiposo subcutáneo. En la parte inferior de la figura se muestra una ampliación de la zona en la que están las 6 manchas correspondientes a las citoqueratinas propias del tejido adiposo omental. Con círculos blancos se indican las ausencias de dichas proteínas en el gel correspondiente al depósito subcutáneo.



**Figura 4: Imágenes de los geles bidimensionales realizados en un rango de pH de 3-11 NL.** A la izquierda se muestra la imagen correspondiente a la superposición de las señales de fluorescencia que generan los fluorocromos empleados en el 2D-DIGE. A la derecha se muestra el mismo gel teñido con plata donde se indican las manchas que se han identificado por MS (Tabla 6).

corresponden con proteínas cuyo punto isoeléctrico está comprendido entre 3 y 11 y cuya masa molecular está comprendida entre 10 y 150 kDa. El módulo de Análisis de Componentes Principales (PCA) del Decyder mostró que las 4 muestras obtenidas del tejido adiposo omental estaban bien diferenciadas de las 4 muestras obtenidas del depósito subcutáneo. De las 2500 manchas, 1195 aparecían en los 4 geles y con ellas se hizo el análisis estadístico para la comparación de medias mediante la t de Student. Se encontraron cambios significativos ( $p<0,05$ ) en la abundancia de 70 manchas. Uno de los geles se tiñó con plata para extraer las manchas y proceder a su identificación por espectrometría de masas. Se identificaron 43 proteínas cuyos niveles de expresión eran diferentes entre ambos depósitos grasos, de las cuales 34 estaban aumentadas en el tejido adiposo omental y 9 en el tejido adiposo subcutáneo (figura 4, Tabla 6) (Perez-Perez et al., 2009).

La electroforesis bidimensional acoplada a masas es la técnica más utilizada para el estudio de diferencias en los niveles de proteínas, no obstante, presenta una serie de limitaciones: las proteínas poco abundantes, las proteínas muy hidrofóbicas y las que tienen pesos moleculares o puntos isoeléctricos extremos no suelen estar representadas, por tanto, podrían perderse algunas de las proteínas implicadas en la patogénesis de la enfermedad. En el estudio descrito, para reducir la variabilidad interindividual analizamos un grupo reducido de sujetos: del mismo género (hombres), con IMCs parecidos y similares parámetros clínicos. Por otro lado, en nuestro análisis hemos empleado tejido completo lo que tiene la desventaja de no poder atribuir a un tipo celular concreto la mayor o menor expresión de una determinada proteína, si bien esto, tiene la ventaja de que los resultados son obtenidos directamente a partir de biopsias humanas y por consiguiente, no han

## Resultados y Discusión

**Tabla 6: Proteínas identificadas con expresión diferente entre el depósito graso omental y el subcutáneo.**

Mancha	p-valor	Ratio	Accesión	Nombre	Mascot	PM	pI	Pep	Cob
1	4,70E-02	1,4	Q1L857_HUMAN	Ceruloplasmin	195	116,2	5,4	8	10
2	3,50E-02	1,5	HS90A_HUMAN	Heat shock protein HSP 90-alfa	306	85	4,9	26	37
			HS90B_HUMAN	Heat shock protein HSP 90-beta	139	83,6	5	11	19
3	1,60E-03	5,6	K1C19_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 19	385	44,1	5	18	39
4	2,80E-03	-1,8	CYB5_HUMAN	Cytochrome b-5 isoform 2	171	11,3	5	4	58
5	2,20E-02	-2	FIBG_HUMAN	Fibrinogen gamma	201	46,8	5,5	11	38
6	4,30E-02	1,4	ANT3_HUMAN	Antithrombin III	408	49,4	6	14	41
7	2,30E-02	-1,3	ANXA5_HUMAN	Annexin A5	495	36	4,9	19	55
8	3,50E-02	1,6	IF4A1_HUMAN	Eukaryotic translation initiation factor 4A isoform 1	417	46,4	5,3	6	19
			IF4A2_HUMAN	Eukaryotic initiation factor 4A-II	153	46,6	5,3	8	19
9	4,10E-02	1,3	APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	105	28,1	5,3	8	33
10	8,30E-02	2,5	K1C18_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 18	176	47,3	5,3	13	34
11	1,90E-03	7	K2C7_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 7	160	51,4	5,4	10	26
12	2,60E-04	3,1	APOE_HUMAN	Apolipoprotein E	152	36,2	6	4	11
13	1,50E-02	1,7	FIBG_HUMAN	Fibrinogen gamma	328	48	5,5	12	40
14	3,50E-02	4,7	K2C8_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 8	206	53,5	5,5	15	37
15	2,80E-03	5,9	EST1_HUMAN	Carboxylesterase 1	171	56,4	5,9	5	8
16	6,10E-03	1,5	HSPB1_HUMAN	Heat shock protein 27	285	22,4	7,8	6	40
17	1,40E-02	1,5	FIBG_HUMAN	Fibrinogen gamma	256	46,8	5,5	9	24
18	8,80E-03	-1,4	PSA1_HUMAN	Proteasome subunit, alpha 1, isoform CRA_b	152	34,2	6,6	6	19
19	7,30E-03	1,3	FIBG_HUMAN	Fibrinogen gamma	186	46,8	5,5	11	38
20	6,20E-03	1,6	FABP5_HUMAN	Fatty acid binding protein 5, epidermal	187	15,5	6,6	5	41
21	4,20E-02	1,5	SBP1_HUMAN	Selenium binding protein 1	428	52,9	5,9	14	31
22	4,80E-02	-1,5	EST1_HUMAN	Carboxylesterase 1	197	56,4	5,9	7	13
23	2,60E-03	3	AL1A1_HUMAN	Aldehyde dehydrogenase 1A1	382	55,5	6,3	14	31
24	4,20E-02	1,4	DLDH_HUMAN	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	243	50,7	6,5	9	26
25	5,10E-03	-1,6	ALDOC_HUMAN	Fructose-bisphosphate aldolase C	291	39,8	6,4	11	35
			PCBP1_HUMAN	Poly(rC) binding protein 1		38	6,7	10	44
26	3,80E-03	1,5	TKT_HUMAN	Transketolase	218	68,5	7,6	7	18
27	4,90E-02	1,6	CO4A_HUMAN	Complement C4-A	152	189,1	6,7	13	7
28	2,50E-02	1,6	ADH1B_HUMAN	Alcohol Dehydrogenase 1B	133	40,5	8,5	7	26
29	4,40E-02	1,4	G3P_HUMAN	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	235	36,2	8,3	7	29
30	1,90E-03	7	K2C8_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 8		53,5	5,5	9	22
31	7,10E-03	1,3	RSSA_HUMAN	40S ribosomal protein SA (Laminin receptor 1)	338	19,9	8,4	10	61
32	2,80E-02	1,4	CPNS1_HUMAN	Calpain small subunit 1	197	21,4	4,9	5	26
33	3,20E-02	1,3	GSTP1_HUMAN	Glutathione S-transferase P	330	23,4	5,1	5	36
34	3,00E-02	1,2	Q6PIH6_HUMAN	IGKV1-5 protein	224	26,5	6,3	8	40
35	3,50E-02	1,6	HSP71_HUMAN	Heat shock 70 kDa protein 1	158	42,2	6,6	4	14
36	4,70E-02	1,3	TPIS_HUMAN	Triosephosphate isomerase	353	26,9	6,5	12	48
37	3,10E-02	-1,8	MGLL_HUMAN	Monoglyceride lipase isoform 2	240	33,5	6,5	6	21
38	1,70E-02	-2	THTR_HUMAN	Thiosulfate sulfurtransferase	339	33,6	6,8	11	40
39	3,90E-02	1,2	PEBP1_HUMAN	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	452	21,2	7	13	60
40	4,10E-02	1,5	ANXA2_HUMAN	Annexin A2 isoform 2	315	38,8	7,6	17	48

De izquierda a derecha: **Mancha** indica el número de la mancha que se identificó de acuerdo a la figura 4, el **p-valor** indica el valor de la p tras la aplicación del t-test, **ratio** indica la magnitud de la diferencia de niveles entre las dos condiciones para cada proteína, es positivo para las que estaban aumentadas en el depósito omental y negativo para las proteínas aumentadas en el depósito subcutáneo, la accesión indica el código de la proteína según la base de datos Swiss-Prot., el **Mascot** indica la significación estadística de la identificación de cada proteína, **PM** es el peso molecular en kDa, **pI** es el punto isoeléctrico, **Pep** es el número de péptidos identificados y **Cob** es el porcentaje de secuencia cubierta de la proteína identificada.

sufrido ningún tipo de artefacto que podría generarse durante la separación de los distintos tipos celulares. Por último, en este tipo de análisis no se puede descartar la posibilidad de que algunas de las diferencias de expresión encontradas podrían ser falsos positivos, por este motivo en este estudio se han incluido unas validaciones que han consistido en investigar si determinadas proteínas identificadas con expresión diferencial entre ambos depósitos grados también presentan el mismo comportamiento cuando se estudian con una aproximación experimental diferente tal como es el Western-Blot (WB).

#### **4.1.1. Análisis de las proteínas identificadas en el estudio 2D-DIGE**

Las proteínas diferencialmente expresadas entre ambos depósitos grados se muestran en la tabla 6. Tras un examen preliminar realizamos las siguientes observaciones:

- Había mayores niveles de proteínas relacionadas con inflamación en el tejido adiposo omental respecto del subcutáneo: *Ceruloplasmin*, *Fibrinogen gamma* y *Complement C4-A*. Estos datos confirmaban estudios previos basados en la expresión de mRNA de ambos depósitos grados (Gabrielsson et al., 2003). Además, está establecida una asociación del tejido adiposo omental con una intensa actividad inflamatoria sistémica (Fernandez-Real and Ricart, 2003).
- Encontramos una mayor expresión en el tejido adiposo omental de proteínas relacionadas con procesos metabólicos tales como la *carboxylesterase*, EST1, la *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, GAPDH, la *triosephosphate isomerase*, TPIS, *transketolase*, TKT, la *aldehyde dehydrogenase 1A1*, AL1A1, y la *dihydrolipoil dehydrogenase*, DHL. Estos resultados podrían indicar que el tejido adiposo omental es más activo a nivel metabólico que el subcutáneo.
- Mayores niveles en el depósito omental de proteínas relacionadas con la síntesis de proteínas: la *40S ribosomal protein S4* (RSSA) y de los factores *eukaryotic initiation factor 1 and 2*, (eIF4A1, eIF4A2), junto con la sobreexpresión de las chaperonas HSP90 isoformas A y B, HSP70 y HSP27. Esto apoyaría la hipótesis de que el tejido adiposo omental presenta una mayor tasa de síntesis proteica y en consecuencia tiene mayor necesidad de factores que intervienen en el plegamiento y distribución de los péptidos en crecimiento. En estudios comparativos a nivel de mensajero entre el tejido adiposo omental y el subcutáneo se han descrito alteraciones en la expresión de genes implicados en la síntesis de proteínas incluyendo a RSSA y a EIF4A (Linder et al., 2004) (MacLaren et al., 2008). Además se ha publicado una asociación del gen EIF4A2 con la diabetes de tipo 2 (DM-2) (Cheyssac et al., 2006). Por tanto la sobreexpresión de EIF4A en el depósito omental podría sugerir que

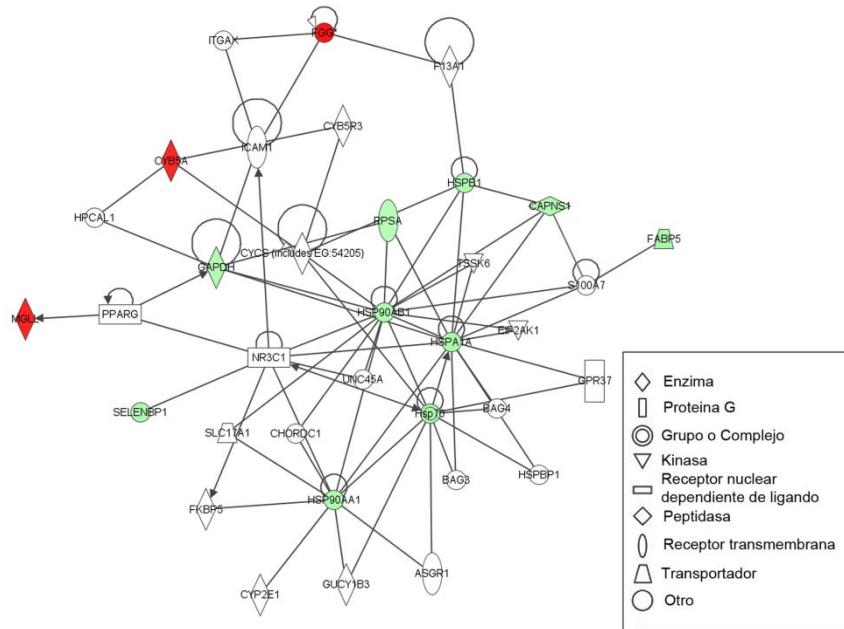
previamente al desarrollo de la DM-2 habría una alteración en la síntesis de proteínas en el tejido adiposo.

- Se ha encontrado que los niveles de la monoglicerido lipasa, MGLL, están aumentados en el depósito subcutáneo respecto del depósito omental, lo cual ha sido ya mostrado con anterioridad mediante estudios de expresión génica (Vohl et al., 2004). Esta enzima funciona junto con la lipasa sensible a hormonas, HSL, (principal lipasa del tejido adiposo), en la hidrólisis de triglicéridos intracelulares almacenados en los adipocitos. A pesar de que se ha encontrado una expresión reducida de HSL en el tejido adiposo subcutáneo de individuos obesos (Large et al., 1999) no hay, hasta el momento, publicaciones que relacionen MGLL con obesidad. Esta proteína también está implicada en la inactivación enzimática del endocannabinoide (EC) *2-arachidonoylglycerol* (2-AG) (Starowicz et al., 2008). Se ha mostrado que el tejido adiposo subcutáneo presenta toda la maquinaria para metabolizar los ECs (Spoto et al., 2006). Además en obesidad, el metabolismo de los ECs está sobreactivado debido a la sobreexpresión del receptor CB1 y a los elevados niveles de ECs (Di Marzo and Matias, 2005). Estos datos previos junto con nuestros resultados nos llevan a sugerir que si la expresión de MGLL en el depósito omental está reducida con respecto al subcutáneo se podría favorecer la acumulación de grasa debido a una señalización por EC incrementada en el tejido adiposo omental.

#### 4.1.2. Análisis “in silico” de las proteínas identificadas

Las proteínas identificadas en el estudio proteómico que acabamos de describir se analizaron mediante la aplicación Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (<http://www.ingenuity.com>). El IPA genera redes donde los nodos son las proteínas introducidas en la aplicación junto con otras proteínas, hormonas, fármacos, etc los cuales están unidos a través de relaciones descritas en las bases de datos. En la red con mayor *score* que generó el IPA se encontraban 12 proteínas halladas en nuestro estudio algunas de las cuales estaban relacionadas entre ellas (figura 5). En dicha red se representaban las funciones celulares: Compromiso Celular, Mantenimiento y Función Celular y Modificaciones Post-traduccionales, lo cual sugirió que proteínas pertenecientes a estas funciones podrían presentar diferencias entre ambos depósitos grasos. Es de destacar que este análisis mostró una relación directa de algunas proteínas con la proteína PPARG, lo que podría indicar que PPARG actúa de manera diferente en ambos depósitos grasos. Aunque no se han realizado estudios comparando los niveles de esta proteína, hay controversia con respecto a los niveles de mRNA de PPARG entre dichos tejidos. Se ha

publicado que este receptor nuclear es más abundante en el tejido adiposo subcutáneo que en el omental en individuos no obesos, mientras que los niveles de mRNA son equivalentes en obesos (Lefebvre et al., 1998). Sin embargo, otro trabajo más reciente ha mostrado una expresión incrementada en el depósito subcutáneo en mujeres obesas (Giusti et al., 2003).



**Figura 5: Red generada por Ingenuity mediante relaciones directas.** En verde se muestran las proteínas que estaban incrementadas en el depósito omental y en rojo las proteínas incrementadas en el tejido adiposo subcutáneo. En el cuadro de la derecha se muestra la clave que indica el tipo de molécula que aparece en cada nodo de la red.

#### 4.1.3. Estudio de las proteínas diferencialmente expresadas

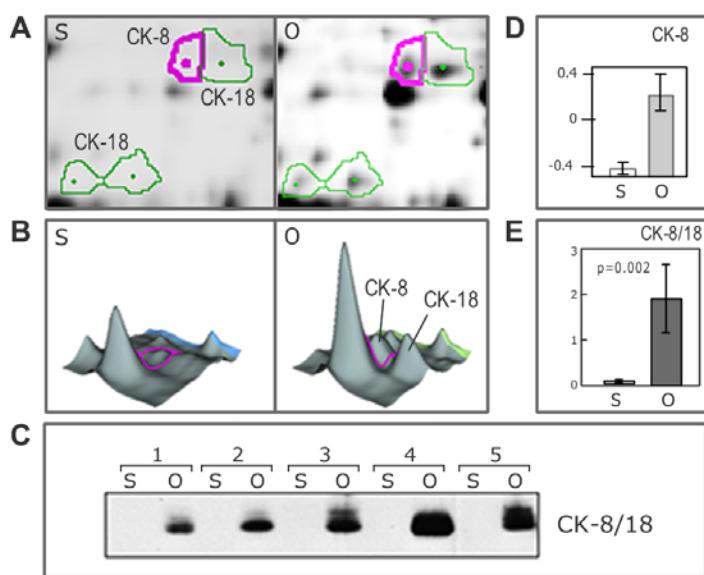
Se eligieron un grupo de proteínas identificadas en el estudio 2D-DIGE para un análisis más detallado. Principalmente se llevó a cabo su validación por WB y su estudio por inmunohistoquímica e inmunofluorescencia. En la validación se empleó un grupo adicional de pacientes, 12 hombres y 9 mujeres, con un rango mayor de IMC (entre 20,03 y 51,9) y con características clínicas similares a los sujetos empleados en el estudio 2D-DIGE en cuanto a la ausencia de desórdenes metabólicos.

##### 4.1.3.1. Estudio de las citoqueratinas epiteliales en tejido adiposo

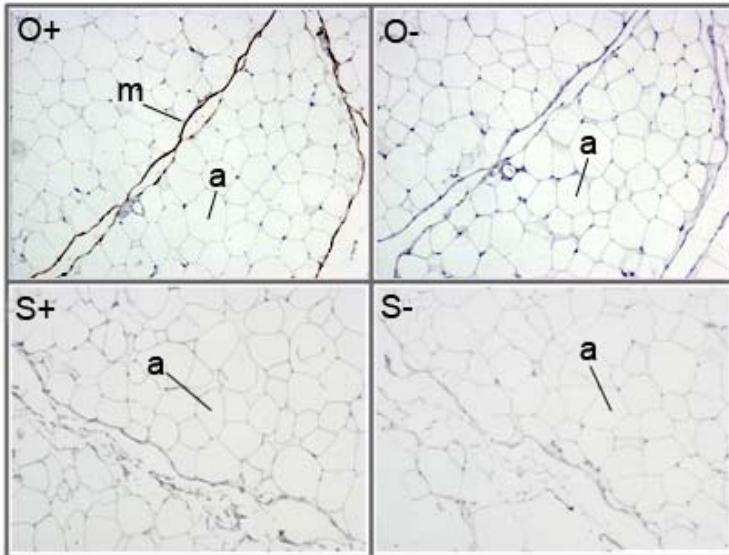
La aparición de citoqueratinas epiteliales CK-7, CK-8, CK-18 y CK-19 en el tejido adiposo omental fue sorprendente e inesperada. Estas proteínas constituyen los filamentos intermedios del citoesqueleto de epitelios monoestratificados secretores como el hígado, el páncreas y la glándula mamaria (Owens and Lane, 2003). En el WB utilizamos un

anticuerpo que reconocía a dos citoqueratinas a la vez (CK-8/18) (figura 6). Este análisis reveló que ambas citoqueratinas se expresaban exclusivamente en el tejido adiposo omental, confirmando así los resultados del estudio 2D-DIGE. Para la realización de la inmunohistoquímica se empleó un anticuerpo que reconocía CK-18. Las imágenes mostraron que esta proteína estaba localizada específicamente en el tejido adiposo omental. Se confirmó que las células que presentaban tinción para CK-18 eran células mesoteliales (Figura 7).

**Figura 6: Expresión de CK-8 y CK-18 en tejido adiposo omental humano.** En A se muestran las imágenes correspondientes a los geles bidimensionales en tejido adiposo subcutáneo (S) y tejido adiposo omental (O) donde se encuentran CK-8 y CK-18. En B se muestran las imágenes tridimensionales que genera el DeCyder a partir de las señales de fluorescencia que se corresponden con la CK-8 y CK-18. En C se muestra una imagen representativa de un WB realizado con el anticuerpo que reconocía a ambas citoqueratinas. En D se muestra la señal correspondiente a la CK-8 obtenida mediante el DeCyder y en E se muestra la señal correspondiente al WB para la CK-8/18. Se indican medias ± desviación estándar.



En humanos se había descrito la presencia de mesotelio únicamente en el tejido adiposo omental. El mesotelio consiste en una red de vainas de peritoneo ricas en células mesoteliales que envuelven a grupos de adipocitos (van Hinsbergh et al., 1990) (Wilkosz et al., 2005). Los resultados de nuestro estudio han mostrado la presencia de citoqueratinas epiteliales CK-7, CK-8, CK-18 y CK-19 únicamente en las células mesoteliales del depósito omental. Aunque la función que desempeñan estas células no es conocida, se ha sugerido que podrían desempeñar un papel importante en el desarrollo de procesos inflamatorios, ya que expresan IL-18 en un estado de obesidad (Daramont et al., 2008). La expresión de IL-18 podría contribuir en parte a la mayor inflamación observada en el tejido adiposo omental frente al subcutáneo. Además, a raíz de nuestros resultados, hemos sugerido que las células mesoteliales podrían favorecer el estrés mecánico que sufren los adipocitos hipertrofiados en obesidad (Peral et al., 2009).



**Figura 7: Inmunohistoquímica de CK-18 en tejido adiposo omental y subcutáneo humano.** Arriba, O+ y O- son dos cortes en serie de tejido adiposo omental incubado con anti-CK-18 (O+) y sin él (O-). Abajo S+ y S- son dos cortes en serie de tejido adiposo subcutáneo incubado con CK-18 (S+) y sin él (S-), “m” indica mesotelio, “a” indica adipocito.

#### 4.1.3.2. Estudio de las “heat shock proteins” (HSPs)

Nos resultó llamativo los niveles elevados en el tejido adiposo omental de tres proteínas pertenecientes a la misma familia, las *heat shock proteins* (HSPs) 90, 70 y 27 (HSP90, HSP70, HSP27). Las HSPs no sólo funcionan como chaperonas controlando el plegamiento de proteínas que se sintetizan en el citoplasma, y en el interior de otros orgánulos tales como el retículo endoplásmatico (RE) y la mitocondria (Young et al., 2004), sino que intervienen en numerosos procesos biológicos (Sumanasekera et al., 2003, Sun and Liao, 2004, Calderwood et al., 2006, Lanneau et al., 2008). Los WB de estas tres proteínas revelaron que sus niveles de expresión eran significativamente más altos en el tejido adiposo omental (figura 8) independientemente del IMC y del género, por tanto, confirmando los resultados del estudio 2D-DIGE.

Se ha encontrado que en músculo esquelético la HSP70 está disminuida en pacientes con DM-2 (Kurucz et al., 2002, Chung et al., 2008) y que en modelos de ratón un aumento en los niveles de HSP70 protege del desarrollo de diferentes patologías asociadas a obesidad (Chung et al., 2008). También se ha encontrado que la HSP70 está genéticamente asociada a la obesidad y a DM-2 en estudios caso-control (Chouchane et al., 2001). Además, en estudios proteómicos en los que se examinaron cultivos primarios de células humanas derivadas del tejido adiposo se observó una expresión de HSPs asociada a la adipogénesis (DeLany et al., 2005).

Recientemente se ha sugerido que la ruta UPR (respuesta al despliegamiento de proteínas) está implicada en el inicio de la respuesta inflamatoria y además este proceso parece que es fundamental en la patogénesis de enfermedades inflamatorias tales como la

obesidad (Zhang and Kaufman, 2008). La ruta UPR se activa cuando aparecen distintos tipos de estrés como la escasez de oxígeno, o de glucosa lo que provocaría una acumulación de péptidos desnaturalizados en la luz del RE. Es de destacar que la HSP90 está implicada en esta ruta (Marcu et al., 2002) ya que se une a los dominios citoplasmáticos de IRE1 $\alpha$  y PERK, dos de las quinasas transmembrana que funcionan como sensores del estrés del RE. Por tanto podríamos sugerir que la sobreexpresión de HSP90 en el tejido adiposo omental se debería a una acumulación de proteínas desplegadas en el RE del tejido adiposo omental. Para estudiar esta hipótesis comparamos los niveles de expresión entre el tejido adiposo omental y el subcutáneo de GRP78 en un grupo de individuos obesos. Esta proteína está localizada en la luz del RE y se ha descrito su inducción en condiciones de estrés (Lee, 1992), además interviene en la ruta de UPR participando en el plegamiento de los péptidos (Bertolotti et al., 2000).

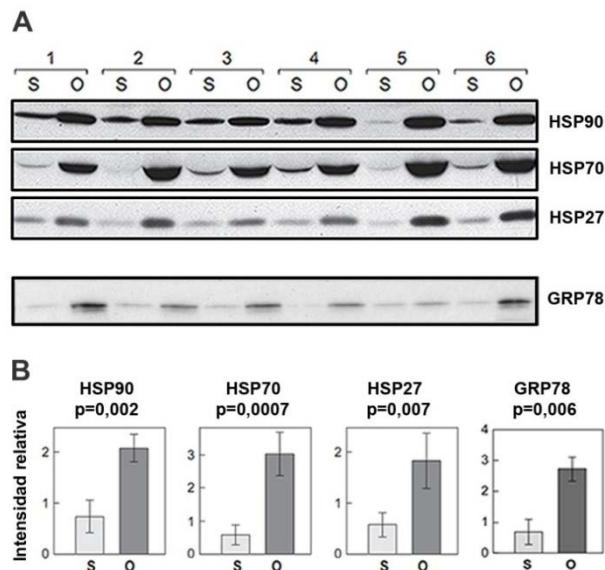


Figura 8: Western-blot representativos de las HSPs y de la GRP78 empleando muestras de tejido adiposo omental y subcutáneo de 6 pacientes. En el panel A se muestran las imágenes de las bandas correspondientes a la HSP90, HSP70, HSP27 y la GRP78. En el panel B se muestran las gráficas con las medias de la intensidad relativa de las bandas de cada proteína en los depósitos grasos subcutáneo (S) y omental (O), las barras de error representan las desviaciones estándar.

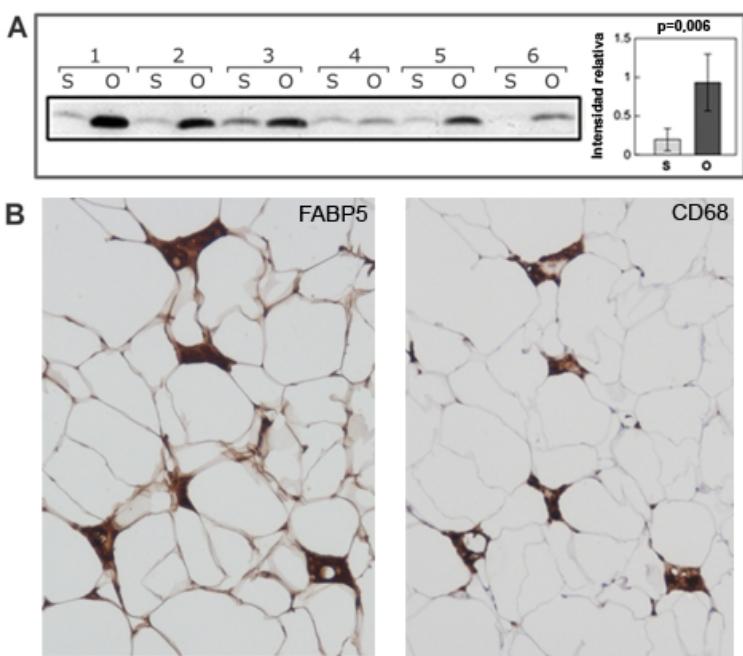
Tal como indica la figura 8 la expresión de GRP78 estaba significativamente aumentada en el tejido adiposo omental respecto del subcutáneo de pacientes obesos. Sin embargo, cuando incluimos en el estudio a individuos con IMC inferior a 30 los niveles de GRP78 también estaban aumentados en el tejido adiposo omental, en consecuencia, la obesidad no estaba originando unos niveles incrementados de GRP78 en este depósito sino que los niveles de GRP78 eran intrínsecamente mayores en el tejido adiposo omental. Estos resultados nos inducen a pensar que la mayor expresión de GRP78 en la grasa omental podría deberse a una gran demanda de factores necesarios para el plegamiento de nuevos péptidos originada por una tasa mayor de síntesis de proteínas en este depósito,

como sugería la sobre-expresión de varias proteínas implicadas en la síntesis proteica en el tejido adiposo omental con respecto al subcutáneo.

#### **4.1.3.3. Análisis de la proteína *fatty acid binding protein 5 (FABP5)***

La FABP5 desempeña un papel importante en el tejido adiposo no sólo para el transporte de ácidos grasos que se generan en la lipólisis del adipocito, sino también para el transporte de ácido retinoico hasta el núcleo favoreciendo las rutas de supervivencia celular (Schug et al., 2007). El análisis por WB de FABP5 reveló que los niveles de esta proteína estaban incrementados en el depósito omental respecto del subcutáneo de igual forma que en el estudio proteómico (figura 9A). Esta proteína también se estudió por inmunohistoquímica para determinar su distribución celular en el tejido adiposo. Se observó tinción en el núcleo y en el citoplasma de las células del tejido adiposo, tanto en adipocitos como en la fracción estroma-vascular (SVF). Particularmente destacó la presencia de FABP5 en unos acúmulos celulares que se asemejaban a las estructuras en forma de corona descritas previamente (Cinti et al., 2005), y que consisten en una agregación de macrófagos que rodean y fagocitan adipocitos. Para confirmar esta observación se analizaron FABP5 y CD68, un marcador de macrófagos (Holness and Simmons, 1993), en cortes seriados consecutivos de tejido adiposo y se observó que ambas proteínas aparecían en dichas estructuras en forma de corona (figura 9B). Las estructuras en forma de corona también se hallaron en numerosos análisis de inmunofluorescencia de biopsias de tejido adiposo usando los anticuerpos contra FABP5 y CD68 en los que se apreciaba de igual forma la superposición de las señales de FABP5 y de CD68 en las estructuras en forma de corona (figura 10).

Tanto FABP5 como el receptor nuclear PPAR $\delta/\beta$  se han implicado en rutas de señalización de supervivencia mediante la unión de ácido retinoico (Schug et al., 2007). Sorprendentemente en este estudio proteómico se encontraron niveles incrementados de FABP5 en el tejido adiposo omental con respecto al subcutáneo, además de otras dos proteínas implicadas en la síntesis de ácido retinoico: la *retinal dehydrogenase 1A1* (AL1A1) y la *alcohol dehydrogenase 1* (ADH1B). La ADH1B sintetiza retinaldehido a partir de vitamina A y la AL1A1 cataliza la síntesis de ácido retinoico a partir del retinaldehido (Duester et al., 2003). Por tanto, un potencial incremento en los niveles de ácido retinoico debido a mayores niveles de ADH1B y AL1A1, junto con la expresión incrementada de FABP5 podría sugerir que las rutas de supervivencia están incrementadas en el tejido adiposo omental respecto del subcutáneo. Por otro lado, ratones que carecían de AL1A1



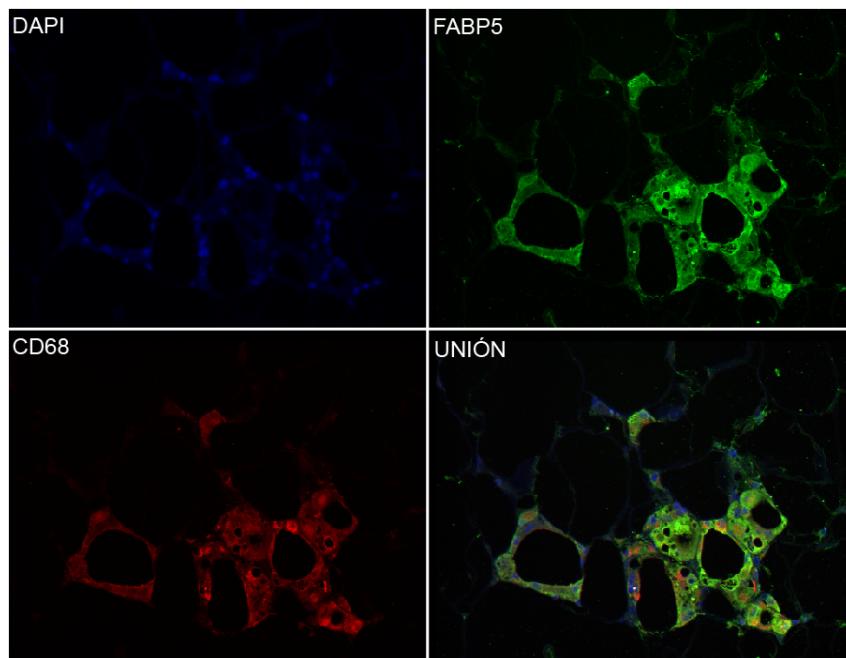
**Figura 9: Sobre-expresión de FABP5 en el tejido adiposo omental respecto del subcutáneo.** En el panel A se muestra un WB representativo en el que se incluyeron 6 individuos, junto con la gráfica donde se representan las medias de intensidad relativa de expresión de FABP5. En el panel B se aprecia que las señales obtenidas mediante inmunohistoquímica de FABP5 y CD68 coinciden en 2 cortes seriados de tejido adiposo omental, aunque FABP5 también tiñe el citoplasma de los adipocitos.

presentaron un fenotipo de resistencia a obesidad inducida por dieta hipercalórica (Ziouzenkova et al., 2007). Es posible por tanto, que los niveles elevados de AL1A1 en el depósito omental podrían estar favoreciendo una mayor acumulación de grasa en este tejido respecto del subcutáneo.

En el tejido adiposo, junto a FABP5, desempeña una función muy importante una proteína de la misma familia que ha sido ampliamente descrita en la literatura científica, la FABP4. En nuestro estudio hemos analizado los niveles de expresión de FABP4 en los dos depósitos grasos. Como se observa en la figura 11A, FABP4 estaba significativamente incrementada en el tejido adiposo omental. Por lo tanto, ambas proteínas, FABP4 y FABP5, se expresan más en el depósito omental que en el subcutáneo. Tanto el tejido adiposo omental como el subcutáneo se digirieron con colagenasa y se separaron los adipocitos de la SVF. Se extrajeron las proteínas de ambas fracciones y se analizaron los niveles de expresión de FABP4 y FABP5. Observamos que FABP4 apenas se expresaba en la SVF, mientras que sí se observó expresión de FABP5 en la SVF (figura 11C).

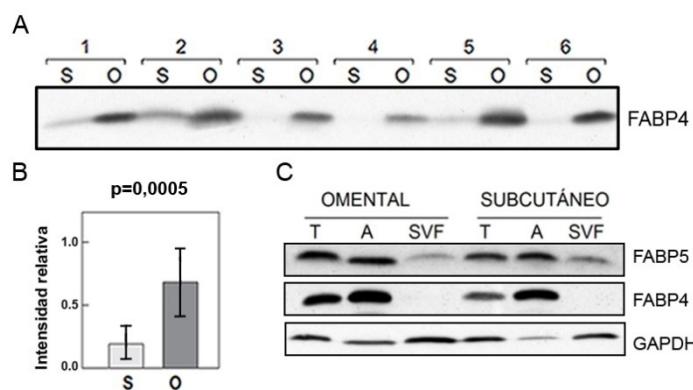
Tanto FABP4 como FABP5 podrían jugar un papel muy importante en el desarrollo de patologías asociadas a obesidad tal como indican los estudios realizados en ratones modificados genéticamente (Coe et al., 1999, Hertzel et al., 2002, Maeda et al., 2003, Maeda et al., 2005). Sin embargo, en el tejido adiposo no sólo los adipocitos sino también los macrófagos expresan ambas proteínas. Es conocido que la razón FABP4/FABP5 es 99:1 en los adipocitos (Simpson et al., 1999) y 1:1 en los macrófagos (Makowski et al., 2001). Nosotros encontramos que la relación FABP4/FABP5 en tejido adiposo total era 23:1,

para ello comparamos las manchas correspondientes a FABP4 y a FABP5 en 8 geles 2D de tejido adiposo.



**Figura 10: Detección mediante inmunofluorescencia en tejido adiposo omental de FABP5 y CD68.** La señal de CD68, en rojo, muestra unas estructuras en forma de corona alrededor de los adipocitos que solapan con la señal de FABP5, en verde, por tanto los anticuerpos reconocen las mismas células. En azul se muestra la tinción con DAPI de los núcleos.

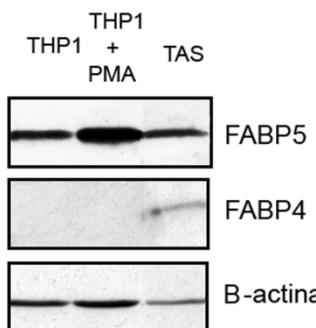
**Figura 11: Expresión de FABP4, en tejido, en la SVF y en los adipocitos aislados del depósito graso omental y del subcutáneo.** En A se muestra la expresión de FABP4 en 6 pares de tejido adiposo omental (O) y subcutáneo (S). En B se representa la intensidad relativa de la expresión de FABP4 entre ambos depósitos grasa, se indican las medias y la desviación estándar. En C podemos apreciar los niveles de expresión de FABP5 y FABP4 en la SVF, en los adipocitos (A) y en tejido total (T) en los depósitos grasa omental y subcutáneo. La GAPDH se usó como control de carga.



#### • Estudio de la expresión de FABP5 y FABP4 en macrófagos

Hace tiempo que se relacionó una alta expresión de FABP5 con una reducida sensibilidad a insulina (Hertzel et al., 2002), y una menor expresión de FABP5 con una sensibilidad incrementada a la insulina (Maeda et al., 2003). Además se observó que la

deleción selectiva de los genes FABP4 y FABP5 en los adipocitos redujo la expresión de moléculas pro-inflamatorias en los macrófagos. Cuando la misma delección afectó específicamente a los macrófagos aumentó la señalización por insulina en los adipocitos, por consiguiente, la expresión de ambas FABPs es crítica para el proceso inflamatorio propio de la degeneración metabólica (Furuhashi et al., 2008). Estos datos junto con nuestros resultados de la alta expresión de FABP5 en macrófagos nos llevaron a estudiar más detalladamente si esta proteína se inducía con el estímulo inflamatorio. Por un lado se cultivaron células THP1 y algunos de estos cultivos se trataron con PMA. Se extrajeron proteínas de ambos cultivos y se llevó a cabo un WB para analizar FABP5 y FABP4. Observamos que FABP5 se inducía con el estímulo inflamatorio, sin embargo, no detectamos expresión de FABP4 en ninguno de los cultivos (figura 12).

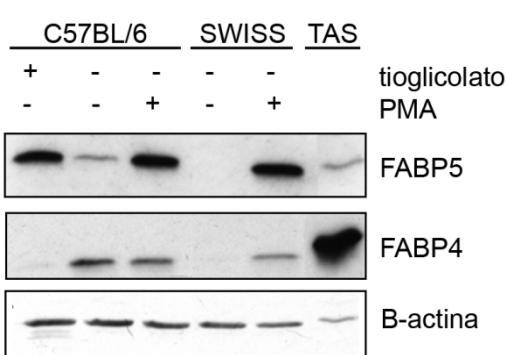


**Figura 12: Expresión de FABP5 y FABP4 en células THP1.** Se representa un WB donde se aprecia un aumento de expresión de FABP5 con el tratamiento de las células THP1 con PMA, sin embargo, FABP4 se expresaba a niveles prácticamente indetectables en dichas células. Se muestra la expresión de ambas proteínas en tejido adiposo subcutáneo (TAS). Se empleó a la B-actina como control de carga.

Además se analizó la expresión de FABP5 y FABP4 en macrófagos extraídos de ratones Swiss y C57BL/6. Se observó una inducción de FABP5 tras el tratamiento de los macrófagos obtenidos de ambas cepas de ratón con PMA (figura 13). Sin embargo, se observó una ligera inducción de FABP4 en los macrófagos extraídos de ratones Swiss tratados con PMA (figura 13). También estudiamos la expresión de FABP5 en macrófagos extraídos *in vivo* de ratones C57BL/6 que habían sido tratados con tioglicolato dos días antes. El tioglicolato es un agente que induce una inflamación sistémica y por tanto favorece la infiltración y diferenciación de macrófagos. El tratamiento con tioglicolato motivó una fuerte inducción de FABP5 (figura 13). Sin embargo, FABP4 no se indujo con el tratamiento con tioglicolato (figura 13). Estos resultados apuntan a una implicación de FABP5 en el estímulo inflamatorio a diferencia de FABP4 cuya expresión no parece estar asociada al estímulo inflamatorio.

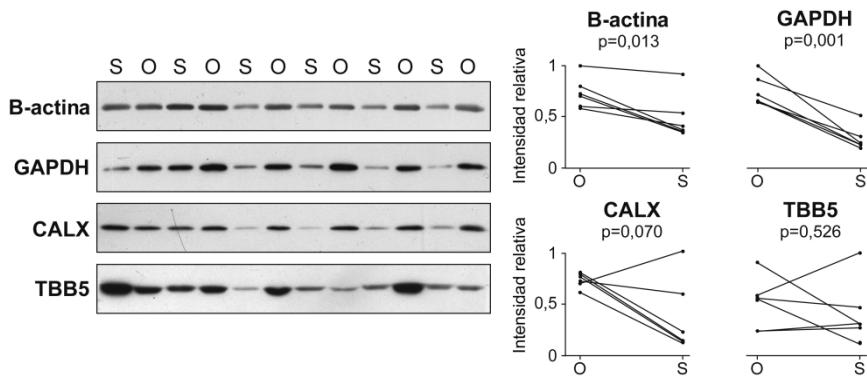
#### 4.1.3.4. Validación de la proteína GAPDH

La gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) es una proteína



**Figura 13: Expresión de FABP4 y FABP5 en macrófagos extraídos de ratones elicidos con tioglicolato y tratados con PMA.** Observamos una gran expresión de FABP5 y no de FABP4 en macrófagos extraídos de ratones C57BL/6 elicidos con tioglicolato y en macrófagos de ratones no elicidos con tioglicolato pero tratados con PMA. También hubo una gran inducción de FABP5 en macrófagos tratados con PMA extraídos de ratones Swiss, en este caso también hubo una pequeña inducción de FABP4. Para efectos comparativos se muestran las señales de tejido adiposo subcutáneo (TAS).

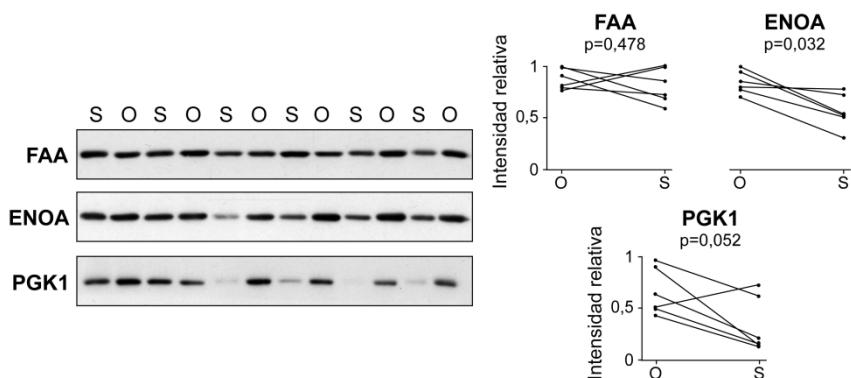
tradicionalmente ubicada en la glucólisis donde en presencia de nicotinamida adenina dinucleótido ( $\text{NAD}^+$ ) y de fosfato inorgánico lleva a cabo la fosforilación oxidativa del gliceraldehído-3-fosfato originando 1-3 bisfosfoglicerato. Esta proteína estaba aumentada en el estudio 2D-DIGE en el tejido adiposo omental con respecto del subcutáneo y en el WB también apareció significativamente aumentada en el depósito omental, confirmándose así el resultado del estudio proteómico. Nos pareció relevante que la GAPDH no se expresara de igual forma en ambos depósitos grasos ya que se suele utilizar para normalizar tanto en estudios de expresión de mensajero como en estudios de expresión de proteína. Sin embargo, estudios previos ya habían mostrado que el mRNA de la GAPDH varía en función del grado de obesidad (Kloting et al., 2007). Estos datos nos llevaron a averiguar cuál sería la proteína de referencia apropiada para usarla como normalizador en nuestros estudios. Para ello, evaluamos la expresión mediante WB de otras proteínas tradicionalmente empleadas como proteínas de referencia tales como la B-actina, beta-tubulina (TBB5) y la calnexina (CALX) empleando para ello muestras de tejido adiposo omental y subcutáneo. Tal como se muestra en la figura 14 la B-actina y la calnexina estaban aumentadas en el depósito omental, al igual que la GAPDH, sin embargo la TBB5 presentaba un patrón de expresión muy heterogéneo con un coeficiente de variación (CV) muy alto, del 59% (el CV da una idea de la heterogeneidad de los valores de una variable, cuanto menor sea su valor mayor es la homogeneidad de los valores). Por tanto, ninguna de estas 4 proteínas podría usarse como proteína de referencia en estudios de expresión de proteínas entre el tejido adiposo omental y el subcutáneo.



**Figura 14.** Expresión de proteínas comúnmente denominadas proteínas de referencia en muestras pareadas de tejido adiposo omental y subcutáneo. En la parte izquierda se indican los WB representativos de la B-actina, GAPDH, CALX y TBB5 con 6 pares de muestras de ambos depósitos grasos. En la parte derecha están las gráficas donde cada línea representa la expresión proteica en cada par de tejidos. Se indica el p valor asociado a la diferencia de las medias de expresión entre ambos tejidos.

#### 4.1.4. Búsqueda de proteínas con perfil de proteínas de referencia

Utilizando los datos del estudio proteómico comparativo entre el tejido adiposo omental y el subcutáneo nos planteamos la identificación de proteínas cuya expresión no variase entre ambos depósitos grasos con el fin de buscar proteínas de referencia para los estudios de expresión proteica. Utilizando el software Decyder se identificaron 12 proteínas con ratio cercano a 1. Estudiamos las que presentaron unos valores de expresión más homogéneos entre sí: la *enolase 1* (ENO1), la *phosphoglycerate kinase 1* (PGK1) y la *fumarylacetoacetase* (FAA). La figura 15 muestra los WB representativos en los que se deducía que la ENO1 estaba aumentada en el depósito omental con significación estadística, la PGK1 presentaba una variación muy alta con un CV del 59%, sin embargo la FAA presentó unos valores de expresión bastante semejantes entre las muestras, con un CV del 16%.



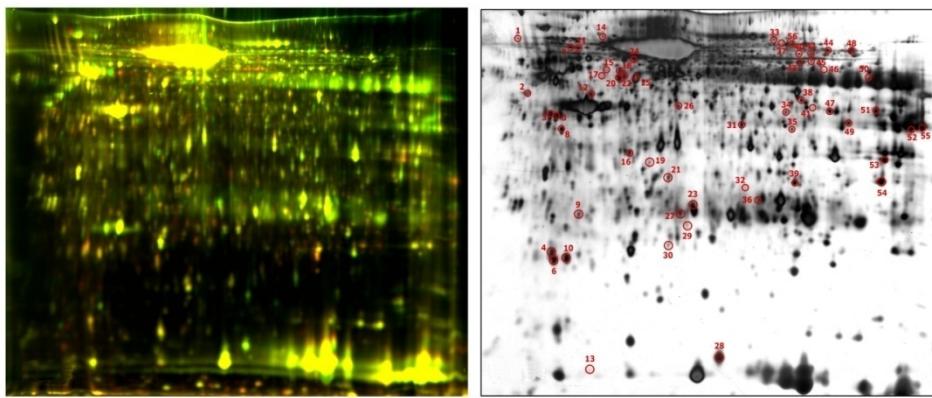
**Figura 15:** Estudio de proteínas identificadas en el estudio 2D-DIGE en pares de tejido adiposo omental y subcutáneo con perfil de expresión de proteínas de referencia. Se muestran los WB de 3 de las proteínas identificadas. En las gráficas se representa la expresión en cada uno de los pares de tejidos empleados en los WB

A continuación, empleamos la FAA para normalizar varias proteínas que habíamos identificado en el estudio comparativo y se mantuvo la significación estadística de las diferencias de medias de expresión. Por tanto, pensamos que la FAA es una buena candidata para ser empleada como proteína de referencia en estudios de expresión proteica entre el tejido adiposo omental y el subcutáneo (Perez-Perez et al., 2012b). La FAA es una enzima que interviene en el catabolismo de la tirosina y nunca antes había sido estudiada en el tejido adiposo. El defecto de FAA causa un desorden autosómico recesivo denominado Tirosinemia de tipo I, esta enfermedad se presenta típicamente durante el primer año de vida en forma de fallo hepático junto con disfunción renal (Tanguay et al., 1990).

#### **4.2. Análisis proteómico comparativo mediante 2D-DIGE para el estudio de la obesidad**

Las proteínas que mostraron expresión diferencial entre el tejido adiposo omental y el subcutáneo nos sugirieron que la tasa metabólica del primero está incrementada, que presenta una mayor capacidad de síntesis proteica, así como un estado inflamatorio incrementado. Nos planteamos, pues, usar el tejido adiposo omental para llevar a cabo un estudio proteómico comparativo entre un grupo de 6 pacientes con obesidad mórbida ( $IMC > 40$ ) y otro grupo de 6 sujetos no obesos ( $IMC < 30$ ). Todos los individuos que formaron parte del estudio fueron mujeres sin enfermedades asociadas a la obesidad y no cumplieron ninguno de los criterios de exclusión expuestos en la sección 3.1 de Materiales y Métodos.

El análisis se llevó a cabo de manera similar al expuesto en el apartado 4.1. En este caso el software DeCyder detectó 2700 manchas en cada gel de las que 1200 aparecían en todos los geles. El análisis de componentes principales (PCA) mostró que el grupo de los obesos estaba diferenciado del grupo de los no obesos. El análisis estadístico mediante el software DeCyder reveló que 70 manchas estaban diferencialmente expresadas con un p-valor significativo ( $p < 0,05$ ), éstas se extrajeron manualmente de un gel teñido con plata para su identificación por MS. Finalmente se identificaron 56 manchas que correspondieron a 44 proteínas diferentes de las que 20 estaban aumentadas y 24 disminuidas en el grupo de los obesos figura 16 y tabla 7 (Perez-Perez et al., 2012a).



**Figura 16.** Imágenes de los geles bidimensionales correspondientes al estudio comparativo del tejido adiposo omental de obesos y no obesos. A la izquierda se muestra la imagen de gel correspondiente a la superposición de la señal de los fluoróforos. A la derecha se muestra la tinción con plata del mismo gel donde se indican las manchas que se han identificado por MS (Tabla 7).

#### 4.2.1. Análisis “in silico” de las proteínas identificadas

Empleamos la aplicación PANTHER (*Protein Analysis Through Evolutionary Relationship*) para clasificar las proteínas en función de los términos de Gene Ontology (GO) de Proceso Biológico y de Función Molecular. Estudiamos de manera independiente las 20 proteínas aumentadas y las 24 proteínas disminuidas con la obesidad. Dicha aplicación comparó las proteínas incluidas en ambas listas con el conjunto de los 19911 genes traducibles empleados como referencia para buscar términos de GO sobre-representados o bajo-representados en las listas de proteínas identificadas en el estudio proteómico.

En cuanto al Proceso Biológico, en el conjunto de las proteínas disminuidas con la obesidad, encontramos dos términos de GO significativamente sobre-representados: *Proceso Metabólico* y *Generación de Metabolitos Precursores y Energía* (figura 17A). Dentro de la clase *Proceso Metabólico* estaban representados los términos de GO *Proceso Metabólico de Lípidos*, *Proceso Metabólico de Hidratos de Carbono* y *Proceso Metabólico de Derivados de los Aminoácidos*. En el conjunto de las proteínas aumentadas con la obesidad había tres términos de GO significativamente sobre-representados: *Proceso Celular*, *Proceso del Desarrollo* y *Organización de Componentes Celulares* (Fig. 17B). Cuando se agruparon las proteínas en términos de GO de Función Molecular obtuvimos que en la lista de proteínas disminuidas con la obesidad la categoría *Actividad Catalítica* estaba significativamente representada (figura 17C), y en la lista de proteínas aumentadas con la obesidad la categoría *Actividad Estructural* fue la única que se encontró significativamente representada (figura 17D). La clasificación en función de los términos de GO de Componente Celular no mostró ninguna pauta diferencial entre las proteínas aumentadas y las disminuidas con la obesidad. El análisis PANTHER nos reveló

Tabla 7: Proteínas identificadas con expresión diferente en el depósito graso omental debido a la obesidad.

Mancha	p-valor	Ratio	Accesión	Nombre	Mascot	PM	pI	Pep	Cob
1	1,60E-02	1,6	LUM_HUMAN	Lumican	191	38,7	6,2	5	14
2	8,00E-03	-2	VIME_HUMAN	Vimentin	273	53,7	5,1	19	47
3	1,20E-02	2,2	K1C19_HUMAN	Keratin 19	372	44,1	5	18	43
4	1,40E-02	2,2	PTRF_HUMAN	Polymerase I and transcript release factor	164	43,5	5,5	6	12
5	3,90E-03	2,2	K1C19_HUMAN	Keratin 19	257	44,1	5	16	39
6	3,00E-02	1,7	PTRF_HUMAN	Polymerase I and transcript release factor	129	43,5	5,5	6	11
			ANXA2_HUMAN	Annexin A2	136	38,8	7,6	9	28
7	2,10E-02	1,5	PLSL_HUMAN	L-plastin	235	70,8	5,3	11	22
			Q4LE35_HUMAN	Integrin alpha-7	157	125,4	5,6	9	10
			LMNB1_HUMAN	Lamin-B1	129	38,3	5,4	9	30
8	3,60E-02	2,1	HSP71_HUMAN	Heat shock 70kDa protein 1A	181	52,2	5,4	7	13
9	3,30E-02	1,7	CO6A3_HUMAN	Collagen type VI, alpha 3 chain	89	345,1	6,4	8	3
10	4,20E-02	1,6	PTRF_HUMAN	Polymerase I and transcript release factor	157	43,5	5,5	6	12
11	5,50E-03	1,8	PLSL_HUMAN	L-plastin variant	240	70,8	5,2	10	18
12	2,00E-02	1,6	ALBU_HUMAN	Albumin, isoform CRA_t	168	60,2	6,7	14	27
13	1,20E-02	2,1	SH3L1_HUMAN	SH3 domain binding glutamic acid-rich protein	87	12,8	5,2	1	8
14	4,70E-02	1,4	NHLC2_HUMAN	NHL repeat containing 2	114	80,2	5,3	4	6
15	6,30E-03	2,6	ALDH2_HUMAN	Mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2	312	56,9	6,6	11	22
16	4,30E-02	-1,5	GBB1_HUMAN	Guanine nucleotide-binding protein	161	37,1	5,6	5	16
17	3,00E-02	1,6	K2C8_HUMAN	Cytokeratin 8	147	53,5	5,5	5	10
18	5,80E-05	2,7	K2C7_HUMAN	Keratin 7	293	51,4	5,4	15	30
19	2,20E-02	1,5	ST1A3_HUMAN	Aryl sulfotransferase	102	34,3	5,8	1	3
20	2,70E-03	2	FIBG_HUMAN	Fibrinogen gamma chain	240	36,5	5,9	7	33
21	3,10E-02	1,9	ANXA1_HUMAN	Annexin I	187	38,9	6,6	5	17
22	3,10E-03	2,3	K2C8_HUMAN	Keratin 8, isoform CRA_d	115	30,8	5	2	8
23	1,90E-03	-2,1	HSPB1_HUMAN	Heat shock protein 27	126	22,4	7,8	2	13
24	4,80E-03	1,6	ALBU_HUMAN	Serum albumin	161	67,8	5,6	12	18
25	1,10E-03	2,6	FIBG_HUMAN	Chain C, human fibrinogen	396	47	5,5	14	51
			K2C8_HUMAN	Cytokeratin 8	366	53,5	5,5	15	37
26	2,00E-03	-1,5	ACY1_HUMAN	Aminoacylase 1	190	46,1	5,8	8	18
27	1,60E-03	1,5	ANXA2_HUMAN	Annexin A2	185	38,8	7,6	7	20
28	1,20E-02	-1,7	FABP5_HUMAN	Fatty acid binding protein 5	277	15,5	6,6	10	68
29	3,10E-02	1,8	ALBU_HUMAN	Albumin, isoform CRA_c	141	27,7	6,4	8	30
30	4,40E-02	1,9	TPIS_HUMAN	Triosephosphate isomerase 1	131	26,9	6,5	7	32
31	1,10E-02	-1,7	ACADS_HUMAN	Short-chain acyl-CoA dehydrogenase	119	44,6	8,1	7	19
32	3,90E-02	-1,5	PNPH_HUMAN	Nucleoside phosphorylase	123	32,3	6,5	3	14
33	3,10E-02	-1,8	TRFE_HUMAN	Serotransferrin precursor	119	77	6,9	9	17
34	6,30E-03	-1,5	ACADM_HUMAN	Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase	158	47	8,6	4	13
35	2,10E-03	-1,5	HIBCH_HUMAN	3-hydroxyisobutyryl-coenzyme A hydrolase	159	49,4	9,4	9	23
36	3,20E-02	-1,5	CAH1_HUMAN	Carbonic anhydrase I	141	28,9	6,6	4	21
37	3,10E-02	1,4	LMNA_HUMAN	Lamin A/C isoform 1 precursor	521	74,4	6,6	22	38
38	4,80E-03	-1,5	FUMH_HUMAN	Fumarate hidratase, isoform CRA_d	174	46,6	6,9	2	6

Mancha	p-valor	Ratio	Accesión	Nombre	Mascot	PM	pI	Pep	Cob
39	6,00E-05	-1,7	ETFA_HUMAN	Electron transfer flavoprotein alpha	167	30,2	8,8	4	20
40	4,30E-02	-1,4	AOFA_HUMAN	Monoamine oxidase A	126	60,2	7,9	4	11
41	1,00E-02	-1,9	CISY_HUMAN	Citrate synthase	109	29,6	7,8	2	7
42	1,10E-02	-1,6	AOFA_HUMAN	Monoamine oxidase A	146	60,2	6,9	6	15
43	4,30E-03	-1,4	CATA_HUMAN	Catalase	278	59,9	6,9	9	25
44	1,30E-02	-1,5	TKT_HUMAN	Transketolase	150	68,5	7,9	10	22
45	3,20E-03	-1,6	CATA_HUMAN	Catalase	195	51,6	7,8	8	23
46	3,10E-03	-1,8	FIBB_HUMAN	Fibrin beta	170	51,4	8	10	26
47	1,40E-04	-1,6	CISY_HUMAN	Citrate synthase	211	45,8	6,5	6	16
48	3,00E-02	-1,7	TKT_HUMAN	Transketolase	178	68,5	7,9	10	25
49	1,00E-02	-1,5	THIL_HUMAN	Acetyl-coenzyme A acetyltransferase 1	129	45,5	9	2	7
50	8,80E-03	-1,5	ATPA_HUMAN	ATP synthase subunit alpha	101	40,4	8,9	1	3
51	1,80E-02	-1,4	ASSY_HUMAN	Argininosuccinate synthetase 1	180	46,8	8,1	7	16
52	1,70E-02	-1,7	ADH1B_HUMAN	Alcohol dehydrogenase beta-3 subunit	220	40,7	8,5	12	32
53	2,70E-02	2	ANXA2_HUMAN	Annexin A2 isoform 2	283	38,8	7,6	15	48
54	1,90E-02	-1,6	HCDH_HUMAN	L-3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase	170	7,6	9,3	4	52
55	4,10E-02	-1,6	ADH1B_HUMAN	Alcohol dehydrogenase beta-3 subunit	212	40,7	8,5	10	28
56	3,50E-02	-1,5	ACSL1_HUMAN	Acyl-CoA synthetase long-chain family	306	78,9	6,8	11	20

De izquierda a derecha: **Mancha** indica el número de la mancha que se identificó de acuerdo a la figura 16; **p-valor** indica el valor de la p tras la aplicación del t-test; **ratio** indica la magnitud de la diferencia de niveles de expresión entre las dos condiciones para cada proteína, con valor negativo para las que estaban disminuidas con la obesidad; **accesión** indica el código de la proteína según la base de datos Swiss-Prot; **Mascot** indica la significación estadística de la identificación de cada proteína; **PM** es el peso molecular en kDa; **pI** es el punto isoelectrónico; **Pep** es el número de péptidos identificados y **Cob** es el porcentaje de secuencia cubierta de la proteína identificada.

que los términos de GO representados en cada una de las dos listas de proteínas eran completamente diferentes entre sí, por tanto el estudio proteómico había identificado un patrón de expresión diferencial de proteínas muy claro entre el grupo de individuos obesos y el grupo de no obesos. También empleamos la aplicación PANTHER para clasificar las 44 proteínas diferencialmente expresadas debido a la obesidad en categorías de Proceso Biológico y de Función Molecular (tabla 8).

#### 4.2.2. Análisis de las proteínas identificadas en el estudio 2D-DIGE

El estudio 2D-DIGE reveló en el grupo de pacientes obesos unos niveles reducidos de proteínas implicadas en rutas metabólicas tales como *Proceso Metabólico de Lípidos*, *Proceso Metabólico de Hidratos de Carbono* y *Proceso Metabólico de Derivados de los Aminoácidos*, lo cual podría sugerir una reducción de la actividad metabólica asociada a la obesidad. Estos resultados han confirmado estudios previos de expresión de mRNA que

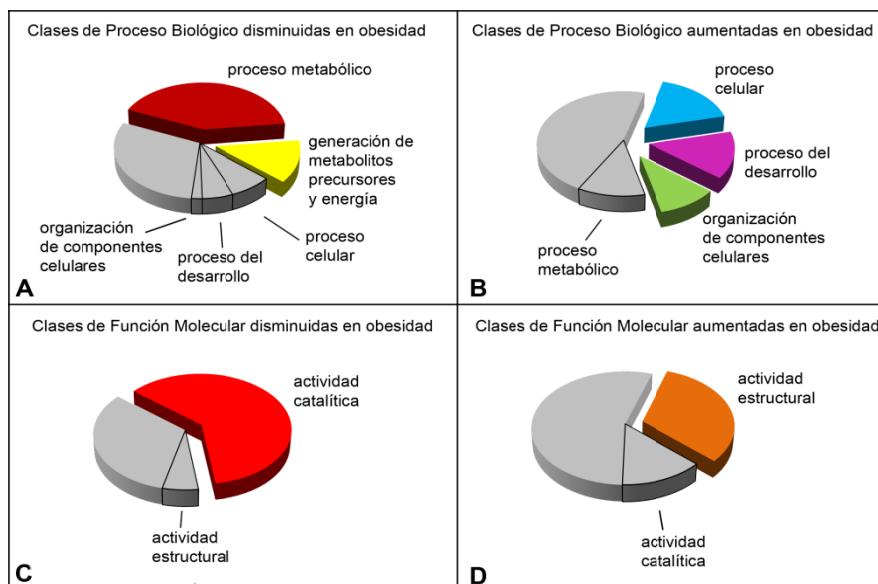


Figura 17: Representación del análisis mediante la aplicación PANTHER de las proteínas identificadas con expresión diferencial entre el tejido adiposo omental de obesos y no obesos. Se indican las clases de Proceso Biológico y de Función Molecular representadas significativamente ( $p<0,05$ ) en el conjunto de proteínas disminuidas (A y C) y en el conjunto de proteínas aumentadas (B y D) con la obesidad. Las clases con  $p$ -valor mayor de 0,05 se muestran en gris. Es importante señalar que el PANTHER puede atribuir varias clases a una misma proteína.

Tabla 8: Algunas proteínas incluidas en los términos de GO representados con significación estadística en los conjuntos de proteínas disminuidas y aumentadas con la obesidad

	Categorías de referencia de GO	Categorías hijas de GO	Proteínas incluidas en los términos de GO
<b>Proteínas disminuidas con la obesidad</b>	<i>Proceso metabólico</i>	<i>Proceso metabólico de lípidos</i> <i>Proceso metabólico de hidratos de carbono</i> <i>Proceso metabólico de derivados de aminoácidos</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>fatty acid-binding protein 5</i> (FABP5),</li> <li><i>acyl-CoA synthetase long-chain family</i> (ACSL1),</li> <li><i>L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase</i> (HCDH),</li> <li><i>transketolase</i> (TKT),</li> <li><i>citrate synthase</i> (CISY),</li> <li><i>alcohol dehydrogenase 1B</i> (ADH1B),</li> <li><i>fumarate hydratase</i> (FUMH),</li> <li><i>aminoacylase-1</i> (ACY-1)</li> <li><i>argininosuccinate synthetase 1</i> (ASSY1).</li> </ul>
	<i>Generación de metabolitos precursores y energía</i>		<ul style="list-style-type: none"> <li><i>monoamine oxidase A</i> (MAOA),</li> <li><i>citrate synthase</i> (CISY),</li> <li><i>ATP synthase subunit alpha</i> (ATPA),</li> <li><i>catalase</i> (CAT),</li> <li><i>electron transfer flavoprotein alpha</i> (ETFA),</li> </ul>
<b>Proteínas aumentadas con la obesidad</b>	<i>Proceso celular</i>		<ul style="list-style-type: none"> <li><i>lamin-B1</i> (LMNB1),</li> <li><i>keratin type I cytoskeletal 19</i> (CK-19),</li> <li><i>keratin type II cytoskeletal 7</i> (CK-7),</li> <li><i>keratin type II cytoskeletal 8</i> (CK-8),</li> <li><i>lamin-A/C</i> (LMNA),</li> <li><i>plastin-2</i> (PLS1),</li> <li><i>collagen</i> (CO6A3),</li> <li><i>fibrinogen gamma</i> (FIBG)</li> <li><i>annexin A1</i> (ANXA1)</li> </ul>
	<i>Proceso del desarrollo</i>		
	<i>Organización de componentes celulares</i>		

Obsérvese que una misma proteína puede estar incluida en más de un término de GO

mostraron que genes que reprimen la lipólisis estaban aumentados y genes que inducen la lipólisis estaban reprimidos con la obesidad (Gomez-Ambrosi et al., 2004). Otro estudio realizado con pacientes obesos mediante el uso de PCR a tiempo real, también mostró una disminución en la expresión de las principales enzimas lipogénicas en la grasa omental con la obesidad (Ortega et al., 2010). Utilizando un modelo murino de obesidad también se concluyó que la expresión de genes asociados a la diferenciación del adipocito estaba disminuida con la obesidad (Nadler et al., 2000). Por tanto, podríamos concluir, que si tanto el metabolismo lipídico como la diferenciación del adipocito están alterados en obesidad, el tejido adiposo obeso no estaría desempeñando correctamente su función de almacén de grasa, lo cual podría ser una de las causas de la deposición ectópica de grasa (McQuaid et al., 2011).

Es notorio el elevado número de proteínas mitocondriales con expresión reducida en el grupo de pacientes obesos (14 de 24), lo que podría indicar una menor actividad del metabolismo mitocondrial, y por tanto, del metabolismo oxidativo con la obesidad. Estos resultados confirmaron otros estudios de expresión de mRNA (Marrades et al., 2010). Además numerosas publicaciones han propuesto que la obesidad está asociada a una alteración en el contenido mitocondrial (Wilson-Fritch et al., 2004, Rong et al., 2007, Patti and Corvera, 2010), siendo muy llamativo el trabajo según el cual en el adipocito el número de copias de DNA mitocondrial está inversamente correlacionado con el IMC (Kaaman et al., 2007). Está ampliamente aceptado que funciones específicas del adipocito tales como el almacenamiento de ácidos grasos, la secreción de adiponectinas (Koh et al., 2007), la señalización por insulina y la captación de glucosa requieren mucha energía (Shi et al., 2008), por tanto un buen funcionamiento del tejido adiposo demandaría un aporte importante de energía y en consecuencia una función mitocondrial óptima.

Mención especial merece la *monoamine oxidase A* (MAOA) cuya expresión disminuida se identificó en el grupo de los pacientes obesos. Previamente y en concordancia con nuestros resultados se había publicado que la actividad de esta proteína estaba disminuida en el tejido adiposo de individuos obesos (Visentin et al., 2004). La MAOA es una enzima mitocondrial implicada en la desaminación oxidativa de muchos neurotransmisores y aminas exógenas. Esta enzima, además, es muy abundante en la fracción adipocítica del tejido adiposo (Pizzinat et al., 1999). La MAOA también se ha estudiado en la adipogénesis usando diferentes linajes murinos y humanos, observándose que se induce con la diferenciación de los adipocitos (Bour et al., 2007).

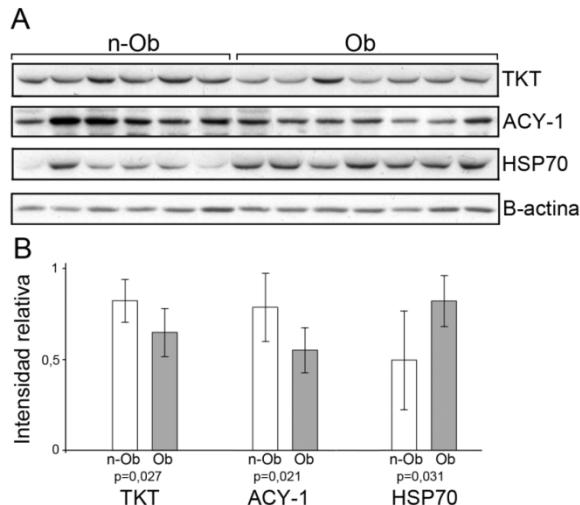
Los términos de GO *Proceso Celular, Proceso del Desarrollo, Organización de Componentes Celulares y Actividad Estructural* corresponden a las proteínas incrementadas con la obesidad según el análisis PANTHER. Estos datos podrían sugerir que el aumento del tamaño que sufren los adipocitos con la obesidad debido a la deposición de grasa está acompañado de: i) cambios en el citoesqueleto (lo que se explicaría por los elevados niveles de lamina A/C, lamina-B1 y de la integrina  $\alpha$  7); ii) cambios en la matriz extracelular debidos al aumento en la expresión de colágeno y *lumican*; iii) modificaciones en la estructura del tejido debido al aumento en la expresión en la citoqueratinas, CK-7, CK-8 y CK-19 que serían compatibles con cambios en el mesotelio del depósito graso omental. Estos resultados coinciden con estudios previos basados en la expresión de mRNA en los que se proponía que el tejido adiposo sufre una remodelación de la matriz extracelular y diversos cambios en el citoesqueleto para adaptarse a la hipertrofia que ocurre en los adipocitos con el desarrollo de la obesidad (Henegar et al., 2008, Poussin et al., 2008).

#### **4.2.3. Estudio de las proteínas diferencialmente expresadas**

Para validar algunas de las proteínas identificadas en el estudio 2D-DIGE se hicieron análisis de WB. Dos de las proteínas estudiadas fueron la transketolasa (TKT) y la aminoacilasa-1 (ACY-1) cuya expresión en tejido adiposo no había sido anteriormente documentada. También se hicieron análisis de WB para estudiar otra proteína que ha sido relacionada previamente con obesidad y DM-2, la HSP70, que previamente habíamos mostrado que tenía mayor expresión en el tejido adiposo omental que en el subcutáneo. El estudio 2D-DIGE identificó la HSP70 aumentada en los individuos obesos respecto de los no obesos, mientras que la TKT y la ACY-1 estaban aumentadas en el grupo de los no obesos. En estos estudios de validación se utilizó un grupo adicional de sujetos que también fueron mujeres, en la figura 18 se muestran las imágenes de los WB donde se confirmaron los resultados del estudio 2D-DIGE.

##### **4.2.3.1. Estudio de la proteína transketolasa (TKT)**

Diferentes estudios han mostrado que la TKT está relacionada con enfermedades neurodegenerativas (Paoletti et al., 1997), con DM-2 (Hammes et al., 2003) y con cáncer (Boros et al., 1997), sin embargo, hasta el momento no se había relacionado esta proteína con obesidad. La TKT es una enzima cuyo grupo prostético es la tiamina difosfato; cataliza varias reacciones de la rama no oxidativa del ciclo de las pentosas fosfato, donde lleva a

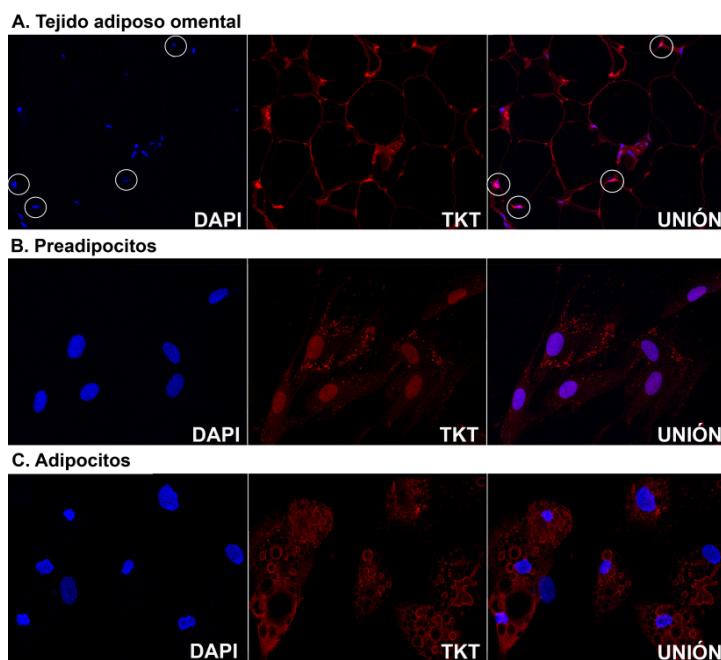


**Figura 18: Validación por WB de varias proteínas identificadas en el estudio proteómico comparativo.** En A se muestran las imágenes de los WB que corresponden a la TKT, la ACY-1 y la HSP70, se empleó a la B-actina para normalizar los resultados. En B se muestran las gráficas en la que se representa la intensidad relativa de expresión de cada proteína en ambos grupos de pacientes. Se representan medias y desviación estándar, además se muestra el p-valor de la diferencia de medias entre los dos grupos.

cabo la transferencia de un grupo de dos carbonos entre dos moléculas de hidratos de carbono. En mamíferos la función de la ruta de las pentosas fosfato es producir pentosas fosfato para la síntesis de ácidos nucleicos y generar NADPH que se emplea en reacciones de destoxicación y en la síntesis de ácidos grasos (Schenk et al., 1998). La TKT ha sido particularmente estudiada en relación con la córnea donde esta proteína es especialmente abundante (Sax et al., 1996). En este contexto, el gen de la TKT fue inactivado mediante recombinación homóloga en ratón, lo que ocasionó la muerte de los embriones homocigotos *tkt*<sup>-/-</sup> en la fase de mórula (Xu et al., 2002). Sorprendentemente, los ratones con un sólo alelo funcional para el gen de la TKT mostraron un crecimiento menor, y en particular presentaron una reducción del 77% de su tejido adiposo y un descenso en los niveles de leptina de 10 veces con respecto al fenotipo silvestre. Estos datos nos indujeron a pensar que la menor cantidad de grasa en los ratones *tkt*<sup>+/+</sup> podría deberse en parte, a unos niveles reducidos de NADPH que impedirían que la lipogénesis funcionase correctamente.

Nuestros resultados han mostrado que en obesidad hay menor expresión proteica de TKT, lo que podría explicarse por un mecanismo de compensación según el cual el tejido adiposo en los individuos obesos tendría reprimida la lipogénesis para evitar nuevos incrementos en su tamaño. Durante el desarrollo de la obesidad se requieren grandes cantidades de NADPH para la síntesis de ácidos grasos, esperaríamos, pues, un nivel elevado de TKT. Por el contrario, en la obesidad establecida (mórbida) en que la expresión de genes implicados en rutas lipogénicas está disminuida (Ortega et al., 2010), unos niveles de expresión de TKT reducidos podrían constituir una adaptación fisiológica dirigida a limitar la expansión del tejido adiposo (Perez-Perez et al., 2012a).

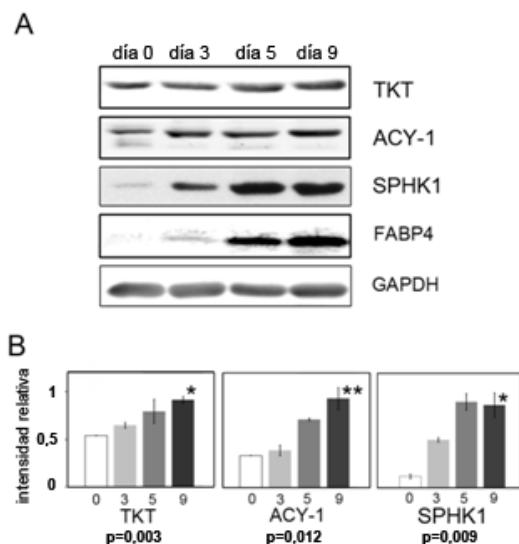
El estudio de la TKT mediante inmunofluorescencia en tejido adiposo omental humano mostró una tinción principalmente citoplasmática tanto en adipocitos como en células de la SVF, confirmando la ubicuidad de esta enzima. También se detectó TKT en algunos núcleos, aunque este análisis no nos permitió averiguar el tipo celular al que correspondían (figura 19A). Además se analizó la localización sub-cellular de la TKT mediante inmunofluorescencia en preadipocitos humanos y en adipocitos diferenciados *in vitro*. Este estudio mostró que en los primeros la TKT estaba localizada mayoritariamente en el núcleo, pero también en el citoplasma, sin embargo en los adipocitos aparecía tinción únicamente en el citoplasma (figura 19B y 19C). Estos resultados nos llevaron a interpretar que la localización nuclear de la TKT en los preadipocitos podría deberse a que las células indiferenciadas tienen una alta capacidad proliferativa y por tanto una alta capacidad para dividir su DNA. Por este motivo estas células tendrían una gran demanda de pentosas fosfato necesarias para la síntesis de ácidos nucleicos, lo que podría explicar la aparición de la TKT en el núcleo. Por otro lado, los adipocitos maduros han perdido su capacidad proliferativa pero sus requerimientos de NADPH para la lipogénesis son más importantes. Este hecho podría explicar el cambio en la localización de la TKT del núcleo al citoplasma inducido por la adipogénesis.



**Figura 19: Detección por inmunofluorescencia de la TKT.** En A se muestra la localización citosólica de la TKT en cortes de tejido adiposo omental. Los círculos indican núcleos donde hay expresión de TKT. En B se muestra la localización nuclear de la TKT en preadipocitos humanos. En C se observa la expresión de TKT en el citoplasma de adipocitos humanos diferenciados *in vitro*. En azul se muestra la tinción con DAPI de los núcleos

También se estudió si los niveles de expresión de la TKT variaban con la adipogénesis en las células de origen murino 3T3-L1. Los resultados mostraron que los

niveles de TKT aumentan con la adipogénesis. A día 9 de diferenciación había un aumento significativo en su expresión ( $p<0,05$ ) con respecto a día 0 (figura 20). Este resultado junto con la redistribución celular que sufre la TKT con la adipogénesis y unido a la alteración en los niveles de TKT con la obesidad nos ha llevado a sugerir que esta proteína podría desempeñar un papel en la biología del tejido adiposo más importante que su mera participación en el ciclo de las pentosas fosfato (Perez-Perez et al., 2012a).



**Figura 20: Expresión de TKT, ACY-1 y SPHK1 en la diferenciación de fibroblastos 3T3-L1.** En A se muestran las imágenes de los WB correspondientes a las proteínas TKT, ACY-1 y SPHK1 a día 0, 3, 5 y 9 de diferenciación. Se empleó FABP4 como control positivo de la diferenciación y GAPDH para normalizar los resultados. B. Se muestran las gráficas de intensidad relativa de la señal correspondiente a la expresión de estas proteínas. Se indica el p valor de la diferencia de medias de expresión de día 9 con respecto a día 0. (\*) indica  $p<0,01$ , (\*\*) indica  $p<0,05$ .

### • Estudio de identificación de interacciones para la proteína TKT

Con la premisa de que la TKT además de en el ciclo de las pentosas fosfato podría estar implicada en otros procesos esenciales en la fisiología del tejido adiposo nos propusimos identificar otras proteínas que interactúan con la TKT. Para ello se hicieron análisis de co-inmunoprecipitación (co-IP) en los modelos celulares HeLa y HEK-293 y se utilizó el vector de expresión en eucariotas pcDNA3/TKT/HA, que expresaba una proteína recombinante TKT-HA, y el vector pcDNA3/HA que expresaba la proteína HA.

Se realizaron 4 reacciones de co-IP en las células HeLa y otras 4 en las células HEK-293. Por cada reacción de co-IP se llevó a cabo un control negativo que consistió en una co-IP realizada con extracto proteico procedente de una transfección con el plásmido pcDNA3/HA. Las proteínas de los 16 inmunoprecipitados se digirieron con tripsina y los péptidos resultantes se resolvieron mediante cromatografía líquida acoplada a un detector de MS, lo que permitió la identificación de las proteínas que había en cada inmunoprecipitado incluyendo a la TKT en todas las reacciones de co-IP excepto en los controles negativos. Se aplicó un test estadístico beta-binomial para seleccionar las

proteínas que con una significación estadística ( $p<0,05$ ) podrían interaccionar con la TKT (tabla 9). Estas proteínas aparecían en todas las co-IP que incluían la TKT y en ninguno de los controles negativos. Es de destacar que la proteína *damage-specific DNA binding protein 1* (DDB1) se identificó en ambas líneas celulares, por lo tanto, podría ser una candidata a interaccionar con la TKT. La DDB1 es una proteína de 127 kDa que funciona formando heterodímeros, y participa en la reparación del daño que induce la luz ultravioleta al DNA (Hwang et al., 1996). Desde hace tiempo es conocido que la deficiencia de DDB1 está implicada en la enfermedad Xeroderma Pigmentosum (Keeney et al., 1994), y es un componente de determinados complejos con actividad ligasa de ubiquitininas (Nishitani et al., 2006). Es de destacar que esta proteína se localiza en el núcleo, lo cual refuerza la hipótesis de que la TKT podría participar en el metabolismo nuclear. Pensamos que dicha interacción permitiría dilucidar un fenómeno de pluriempleo para la TKT que podría contribuir a explicar su papel en la fisiología del tejido adiposo y su alteración con la obesidad.

#### **4.2.3.2. Estudio de la proteína aminoacilasa-1 (ACY-1)**

La aminoacilasa de tipo 1, ACY-1, es una enzima portadora de Zinc, homodimérica, con localización citosólica donde lleva a cabo una recuperación de aminoácidos, ya que cataliza la hidrólisis de los L-aminoácidos acetilados. La ausencia de ACY-1 causa un desorden metabólico congénito caracterizado por una excreción incrementada de aminoácidos acetilados (Van Coster et al., 2005). Aunque el significado clínico no está claro, se ha sugerido que podría desempeñar alguna función en el desarrollo del sistema nervioso central debido a que los individuos con ausencia de ACY-1 presentan un cierto retraso psicomotor (Sass et al., 2006). Otros estudios mostraron que la expresión de ACY-1 se encuentra reducida en cáncer de pulmón (Miller et al., 1989). Más recientemente se ha publicado que la ACY-1 podría tener una función de gen supresor de tumores en un modelo de carcinogénesis renal de rata (Zhong et al., 2009). Es de destacar que nuestro estudio (Perez-Perez et al., 2012a), es el primero que relaciona a esta proteína con el tejido adiposo y con obesidad. El análisis mediante WB reveló que los niveles de expresión de la ACY-1 fueron más abundantes en el tejido adiposo omental de individuos no obesos frente a los obesos, en concordancia con los resultados del estudio 2D-DIGE (figura 18).

Para intentar averiguar el papel de la ACY-1 en el tejido adiposo omental, estudiamos su distribución en este tejido mediante ensayos de inmunohistoquímica e

## Resultados y Discusión

**Tabla 9. Proteínas identificadas mediante LC-MS en las co-IP.**

### HEK-293

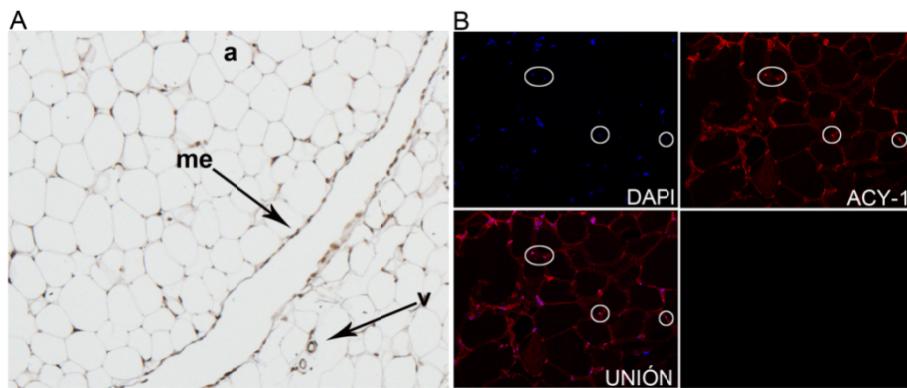
Accesión	Nombre de la proteína	PM	p-valor
P29401	Transketolase	67,9	2,68E-04
Q16531	DNA damage-binding protein 1	127,0	2,67E-03
P62857	40S ribosomal protein S28	7,8	2,00E-02
Q96SW2-1	Protein cereblon	50,5	2,11E-02
Q7Z6E9-1	E3 ubiquitin-protein ligase RBBP6	201,6	2,13E-02
P13639	Elongation factor 2	95,3	2,20E-02
Q16629-1	Serine/arginine-rich splicing factor 7	27,4	2,35E-02
Q9UFE4-2	Coiled-coil domain-containing protein 39	109,9	2,97E-02
Q9H857-1	5'-nucleotidase domain-containing protein 2	60,7	3,06E-02
P24752	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	45,2	3,15E-02
Q9GZT9-1	Egl nine homolog 1	46,0	3,73E-02
Q6PJT7-7	Zinc finger CCCH domain-containing protein 14	82,9	3,74E-02
Q13263-2	Transcription intermediary factor 1-beta	79,5	4,35E-02

### HeLa

Accesión	Nombre de la proteína	PM	p-valor
P29401	Transketolase	67,9	3,5E-06
P15924-1	Desmoplakin	331,8	5,1E-05
O15083	ERC protein 2	110,6	6,2E-03
Q16531	DNA damage-binding protein 1	127,0	2,2E-02
Q8IWT3	Cullin-9	281,2	3,0E-02
O75962-2	Triple functional domain protein	329,4	4,0E-02
Q7L014	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX46	117,4	4,2E-02
Q5JYW1	Forkhead-associated (FHA) phosphopeptide binding domain 1	81,0	4,2E-02
O94880-2	PHD finger protein 14	75,5	4,2E-02
P11362-1	Basic fibroblast growth factor receptor 1	91,9	4,3E-02
Q96MT7	WD repeat-containing protein 52	111,7	4,4E-02
Q9UFE4-2	Coiled-coil domain-containing protein 39	88,2	4,5E-02
A8TX70-2	Collagen alpha-5(VI) chain	289,9	4,7E-02

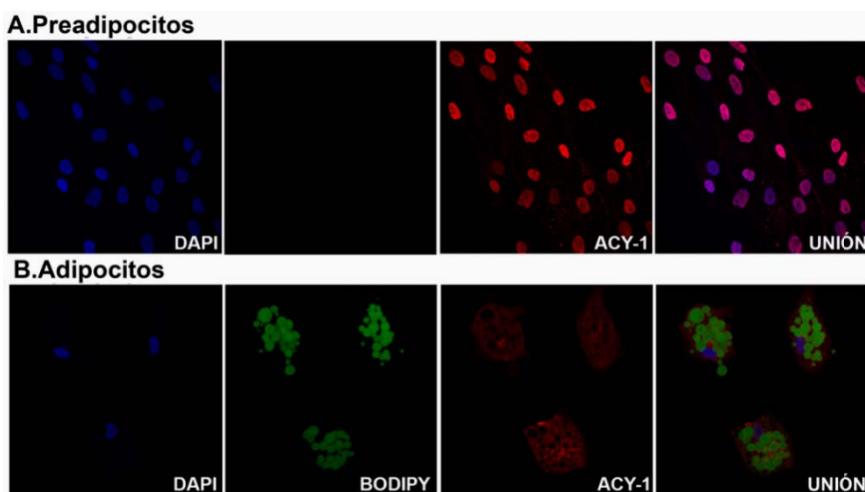
Las células HEK-293 (arriba) y las células HeLa (abajo) se transfecaron con la construcción pcDNA3/TKT/HA. Estas proteínas no aparecieron en ninguna de las réplicas en que se transfeció con la construcción pcDNA3/HA que se usó como control negativo. **Accesión** indica el código de la proteína en la base de datos Swiss-Prot; **PM** es el peso molecular de la proteína expresado en kDa; **p-valor** mostrado es el obtenido tras la aplicación del test beta binomial.

inmunofluorescencia. La inmunohistoquímica mostró una tinción predominantemente citoplasmática (figura 21A), pero la inmunofluorescencia nos permitió apreciar algunos detalles adicionales, como por ejemplo que esta proteína también se localizaba en algunos núcleos en las biopsias de tejido (figura 21B). Adicionalmente estudiamos la localización sub-cellular en cultivos de preadipocitos humanos omentales y en adipocitos diferenciados



**Figura 21: Detección de la ACY-1 en cortes de tejido adiposo omental humano.** A. En la inmunohistoquímica observamos señal en el mesotelio (me) y en los vasos (v), en los adipocitos (a) la señal era más difusa. B. En la inmunofluorescencia se apreciaba señal en el citoplasma y también en algunos núcleos (círculos blancos).

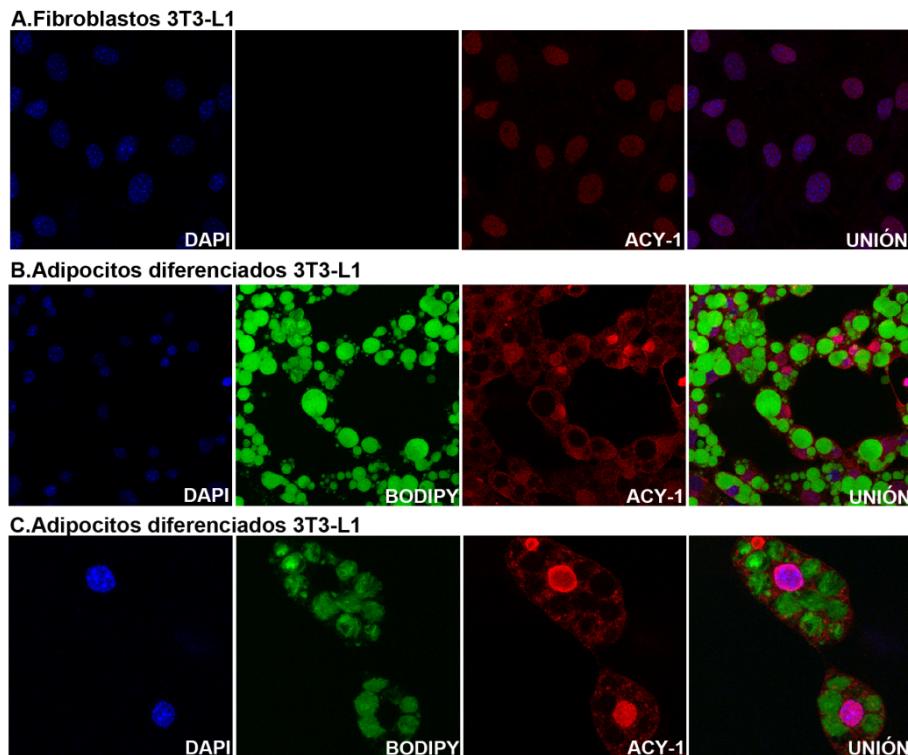
*in vitro*. En los primeros la ACY-1 se expresaba mayoritariamente en el núcleo (figura 22A) mientras que en los adipocitos, la ACY-1 era fundamentalmente citoplasmática, aunque también se apreciaba una débil tinción en el núcleo. Es de destacar que la expresión nuclear de la ACY-1 en adipocitos era mucho menor que en los preadipocitos (figura 22B).



**Figura 22: Inmunofluorescencia de ACY-1 en preadipocitos humanos y en adipocitos humanos diferenciados *in vitro*.** A. En los preadipocitos se observaba la expresión de la ACY-1 en el núcleo. B. En los adipocitos se apreciaba expresión citoplasmática de la proteína aunque también se observaba una tinción nuclear débil. Se empleó la tinción con BODIPY en los adipocitos diferenciados para teñir gotas lipídicas. En azul se muestra la tinción con DAPI de los núcleos.

También estudiamos el comportamiento de la ACY-1 en adipogénesis en el modelo celular murino 3T3-L1, analizando no sólo su localización sub-cellular mediante inmunofluorescencia sino también sus niveles de expresión mediante WB. El análisis de inmunofluorescencia mostró que en las células 3T3-L1 sin diferenciar, la ACY-1 estaba localizada exclusivamente en el núcleo (figura 23A). Sin embargo, cuando las células tenían

gotas lipídicas, y ya son consideradas adipocitos maduros (a día 9 de diferenciación), la señal estaba tanto en el citosol, alrededor de las gotas lipídicas, como en el núcleo (figura 23B, C).



**Figura 23: Inmunofluorescencia de ACY1 en fibroblastos 3T3-L1.** A. En 3T3-L1 se observó expresión de ACY1 en el núcleo. B. En los adipocitos 3T3-L1 se apreció expresión citoplasmática de la proteína aunque también apareció tinción nuclear. C. Muestra un zoom de dos adipocitos 3T3-L1. Se empleó BODIPY para teñir las gotas lipídicas en los adipocitos diferenciados. En azul se muestra la tinción con DAPI de los núcleos.

Adicionalmente se analizó mediante WB cómo variaba la expresión de la ACY-1 con la adipogénesis de las células 3T3-L1, igual que como se ha descrito en el estudio de la TKT, los niveles de expresión de la ACY-1 aumentaron con la diferenciación. A día 9 los niveles eran significativamente mayores ( $p<0,05$ ) que a día 0 (figura 20). Es de destacar, por tanto, que la TKT y la ACY-1 no sólo varían sus niveles de expresión con la adipogénesis, sino que, como hemos descrito, ambas proteínas tienen menores niveles de expresión en los individuos obesos.

Aunque en principio nos resultó sorprendente la localización nuclear de la ACY-1, este hecho ya había sido descrito anteriormente en células renales de rata (Zhong et al., 2009). Es interesante indicar que mediante un sistema de doble híbrido se publicó la existencia de una interacción física entre la ACY-1 y la *sphingosine kinase 1* (SPHK1) lo que además se traducía en una modulación de la actividad de esta última (Maceyka et al., 2004). La SPHK1 es una quinasa de lípidos que cataliza la fosforilación de la esfingosina a

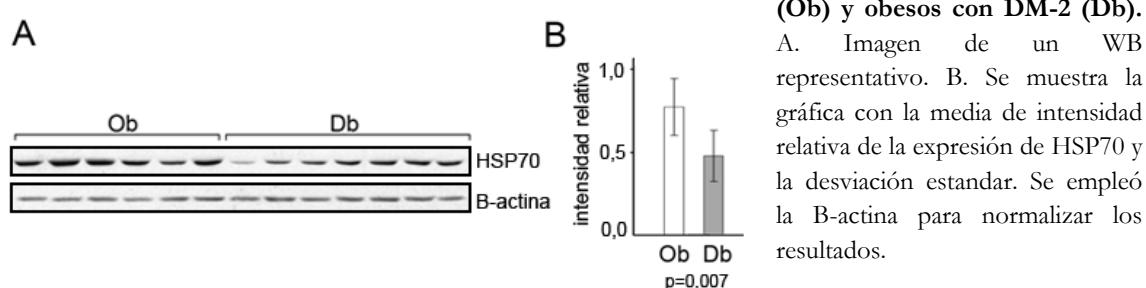
esfingosina 1 fosfato (S1P) empleando para ello el ATP. El S1P es una potente molécula señalizadora implicada en angiogénesis y en crecimiento celular, entre otros procesos celulares (Allende et al., 2003). Además se ha descrito que la SPHK1 promueve adipogénesis en los fibroblastos 3T3-L1, en un trabajo en el que se investigó el papel de dicha proteína en el tejido adiposo (Hashimoto et al., 2009). Para conocer si utilizando nuestros protocolos de diferenciación de células 3T3-L1 se confirmaban estos resultados analizamos la SPHK1 por WB. Como se observa en la figura 20, la SPHK1 se inducía con la diferenciación de los adipocitos 3T3L1 (figura 20), lo cual, reforzaba los datos anteriores que mostraban incrementos de expresión de la ACY-1 con la adipogénesis. Por tanto, la ACY-1 y su posible interacción con SPHK1 podrían desempeñar un papel importante no sólo en la biología del tejido adiposo sino también con respecto a la obesidad.

#### **4.2.3.3. Análisis de la proteína HSP70**

Hace tiempo que se relacionó la aparición de determinados polimorfismos en el gen de la HSP70 con la obesidad (Chouchane et al., 2001) (Zouari Bouassida et al., 2004). Nuestro grupo identificó la HSP70 significativamente aumentada en el tejido adiposo omental respecto del subcutáneo (Perez-Perez et al., 2009) y en el estudio proteómico comparativo de obesos y no obesos ha aparecido significativamente aumentada en el tejido adiposo omental de obesos (Perez-Perez et al., 2012a). Estos resultados apuntan a que esta proteína está modulada en el tejido adiposo. El análisis mediante WB de la HSP70 también mostró que estaba significativamente aumentada ( $p<0,05$ ) en el grupo de pacientes obesos (figura 18). Estudios previos realizados en ratón propusieron que niveles altos de HSP70 en músculo esquelético parecían proteger contra la hiperglicemia, la hiperinsulinemia, la intolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina derivadas de la obesidad (Kurucz et al., 2002, Chung et al., 2008, Gupte et al., 2009). Sin embargo, no existen tales estudios utilizando tejido adiposo. Puesto que el grupo de pacientes obesos que hemos utilizado en los estudios mediante 2D-DIGE y WB no presentaban enfermedades asociadas a la obesidad, es posible sugerir que mayores niveles de HSP70 en obesos podrían contribuir a evitar la aparición de tales patologías. Para poner a prueba esta hipótesis nos planteamos comparar los niveles de esta proteína entre el grupo de obesos sin patologías asociadas a la obesidad y un nuevo grupo de obesos con DM-2 (cuyas características fenotípicas han sido descritas en la tabla 3 de Materiales y Métodos). Tal como muestra la imagen del WB (figura 24), en el grupo de obesos sin DM-2 los niveles de HSP70 estaban aumentados con respecto al grupo de obesos con DM-2. Estos resultados podrían indicar que en el tejido

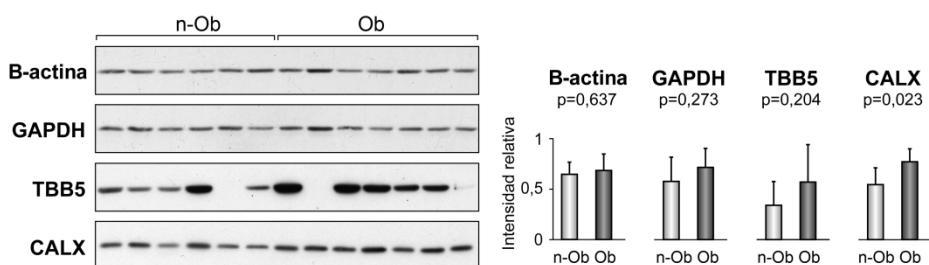
adiposo omental de individuos obesos hay una asociación entre el desarrollo de patologías asociadas a la obesidad y unos niveles reducidos de HSP70.

**Figura 24: Comparación de la expresión de HSP70 en el tejido adiposo omental de obesos sin DM-2 (Ob) y obesos con DM-2 (Db).**



#### 4.2.4. Búsqueda de proteínas con perfil de proteínas de referencia en el estudio comparativo de la obesidad

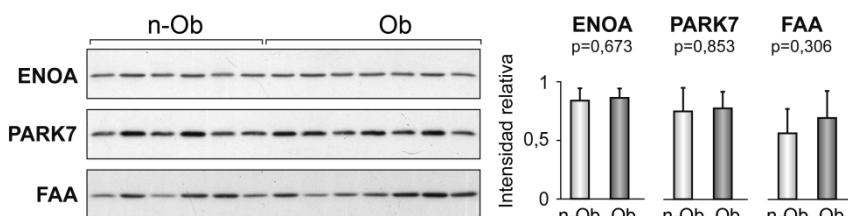
Debido al reducido número de estudios a nivel de proteína en tejido adiposo humano no hay establecidas unas proteínas adecuadas para su uso como referencia en estudios de expresión proteica. Por este motivo nos planteamos realizar una búsqueda de proteínas de referencia. En el tejido adiposo omental de un grupo de individuos obesos y de no obesos estudiamos la expresión de las proteínas tradicionalmente empleadas como referencia, tales como la B-actina, la GAPDH, la TBB5 y la CALX. Observamos que la TBB5 presentó unos niveles de expresión muy heterogéneos, con un CV del 70%; el CV de la GAPDH también fue alto. La CALX mostró unos valores de expresión mayores en el grupo de los individuos obesos. Sin embargo, la B-actina resultó tener un perfil de expresión más estable con un CV del 21% (figura 25).



**Figura 25: Expresión de proteínas de referencia en muestras de tejido adiposo omental de obesos (Ob) y de no obesos (n-Ob).** En la izquierda se muestran WB representativos de B-actina, GAPDH, TBB5 y CALX en un grupo de 6 n-Ob frente a un grupo de 7 Ob. En la derecha se muestran las gráficas donde se representan las medias de expresión de cada proteína en cada grupo de pacientes. Se indica el p-valor.

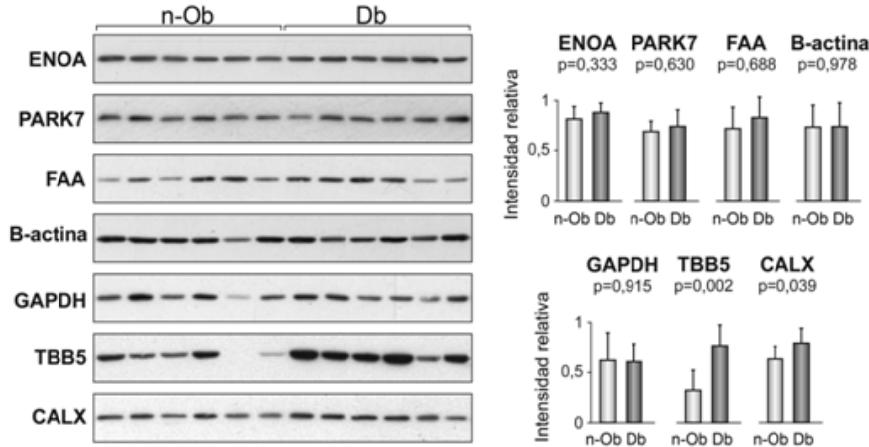
A pesar de que como demuestran los resultados anteriores la B-actina podemos considerarla una proteína de referencia en el tejido adiposo omental, nos propusimos identificar otras proteínas candidatas utilizando los datos del estudio 2D-DIGE descrito en el punto 4.2.1. Mediante el software DeCyder se seleccionaron las manchas cuya media de expresión fuese similar entre el grupo de obesos y de no obesos. Se identificaron 12 proteínas y las 3 que presentaron la menor variabilidad entre las muestras se estudiaron por WB usando los extractos proteicos extraídos del tejido adiposo omental de 26 individuos. Estas proteínas fueron: ENOA, FAA y *Parkinson disease protein 7* (PARK7).

Los análisis por WB mostraron que los niveles de las proteínas ENOA y PARK7 eran muy similares en el grupo de obesos y de no obesos. Además los valores de expresión se mantenían muy estables entre todas las muestras ya que el CV fue del 16% para la ENOA, y del 22% para la PARK7 (figura 26), éste último similar al de la B-actina. Sin embargo, la FAA mostró unos valores de expresión más heterogéneos con un CV del 35% (figura 26). Por tanto, basándonos en estos resultados hemos propuesto a las proteínas B-actina, ENOA y PARK7 como proteínas de referencia en estudios de expresión proteica del tejido adiposo omental (Perez-Perez et al., 2012b).



**Figura 26: Identificación de proteínas con perfil de proteínas de referencia entre obesos y no obesos.** A la izquierda se muestran WB representativos de 3 de las proteínas identificadas. A la derecha se muestran las gráficas con la media de expresión y la desviación estándar de cada uno de grupos de muestras empleados así como el p-valor.

Para investigar si estas proteínas también podrían ser consideradas de referencia en análisis de expresión proteica que incluyeran individuos afectados por DM-2, analizamos los niveles de expresión de estas 3 proteínas en el depósito omental de individuos obesos con DM-2 e individuos no obesos. Adicionalmente, analizamos por WB la expresión de proteínas comúnmente utilizadas en este tipo de estudios utilizando el mismo grupo de individuos (figura 27). Mientras que la ENOA y la PARK7 mostraron los niveles de expresión más estables con unos CV del 13% y del 20% respectivamente, la B-actina, la GAPDH, y la FAA mostraron más inestabilidad en la expresión con CV del 29%, 32% y 33% respectivamente (figura 27) (Perez-Perez et al., 2012b).



**Figura 27: Comportamiento de proteínas de referencia en individuos no obesos (n-Ob) frente a obesos con DM-2 (Db).** En la parte izquierda se muestran las imágenes de los WB representativos. A la derecha, se muestran las gráficas de las medias de expresión en ambos grupos de muestras, las desviaciones estándar y el p-valor.

La PARK7 es una proteína ubicua que está implicada en la enfermedad de Parkinson (Kahle et al., 2009). Aunque se ha encontrado que la PARK7 está modulada en varias condiciones patológicas (Liu et al., 2010, Rai and Shivaji, 2011), nuestros resultados indican que no está alterada en el tejido adiposo omental a causa de la obesidad o de la DM-2. La proteína ENOA está relacionada con diversos procesos biológicos (Feo et al., 2000, Ochi et al., 2002, Lopez-Alemany et al., 2003), pero al igual que ocurría con la PARK7 nuestros resultados indican que sus niveles no se ven afectados por la obesidad ni por la DM-2.

Basándonos en los resultados anteriores podríamos concluir que proteínas que son comúnmente utilizadas como proteínas de referencia en estudios de expresión proteica relacionados con obesidad y/o tejido adiposo, como son la GAPDH y la TBB5, no deberían ser empleadas en futuros análisis (Wu et al., 2001, Gregor et al., 2009, Kovsan et al., 2011). Estos resultados han sido posibles gracias a una optimización en las condiciones de detección de proteínas en los WB para cada uno de los anticuerpos empleados. Hemos sido muy rigurosos en cuanto a la cantidad de extracto proteico empleado, a la dilución de anticuerpo primario y secundario, así como al tiempo de exposición de las películas para que la señal obtenida estuviera en rango lineal. Es de destacar que en el contexto del estudio del tejido adiposo y de la alteración que éste sufre a causa de la obesidad se han publicado genes de referencia a partir de estudios de *microarrays* que han sido validados mediante PCR cuantitativa como son los genes IPO8 (*importina 8*) y FBXL10 (*F-box and leucine rich repeat protein-10*) (Hurtado del Pozo et al., 2010). Sin embargo, creemos que nuestro estudio es el primero que ha identificado proteínas de referencia en el tejido adiposo omental. Además pensamos que haber utilizado un estudio proteómico basado en

2D-DIGE para identificar tales proteínas es novedoso. Consecuentemente proponemos que la B-actina, la ENOA y la PARK7 pueden ser utilizadas como proteínas de referencia en estudios de expresión de proteínas del tejido adiposo omental humano para el estudio de la fisiopatología de la obesidad y la DM-2.

#### 4.3. Reflexiones finales

Habitualmente, para realzar la importancia de los estudios proteómicos se ha argumentado que los niveles de mRNA no suelen tener una correlación con los niveles de proteínas (Chen et al., 2002, Griffin et al., 2002, Lee et al., 2003). Por ese motivo se ha resaltado que tiene mucho más valor el estudio de los niveles de proteínas que el estudio de mRNA. No obstante, según indican otras publicaciones, los cambios a nivel de mensajero presentan una gran correlación con los cambios a nivel de proteína (Orntoft et al., 2002, Lu et al., 2007, Schwanhausser et al., 2011). No debe resultar paradójico entonces, que muchos de los resultados expuestos en esta memoria en cuanto a la expresión de proteínas en uno u otro depósito graso, así como en obesidad, hubiesen sido identificados en estudios de expresión del mRNA (Gomez-Ambrosi et al., 2004, Ortega et al., 2010, del Pozo et al., 2011).

Quisiéramos subrayar que los estudios proteómicos se han llevado a cabo utilizando tejido total en lugar de células aisladas (adipocitos, o bien células de SVF), con el objetivo de no alterar la expresión de proteínas debido a excesiva manipulación del tejido para separar los distintos tipos celulares. También quisiéramos añadir que se ha utilizado la electroforesis bidimensional como método de separación de proteínas en los estudios proteómicos, aún sabiendo que esta técnica presenta varias limitaciones, como por ejemplo, baja detección de proteínas poco abundantes, de alto peso molecular, o bien de un tamaño menor a 10 kDa, así como de proteínas con puntos isoeléctricos extremadamente alcalinos (Corton et al., 2008). A pesar de estas limitaciones nuestros resultados no sólo avalan hallazgos previamente descritos, sino que han supuesto el descubrimiento de nuevas proteínas que son candidatas potenciales para explicar la etiología de la obesidad. La comparación de los dos depósitos grasos ha mostrado que el tejido adiposo omental presenta una actividad metabólica incrementada y un perfil inflamatorio más acentuado que el depósito subcutáneo. A este respecto, hemos identificado que la proteína FABP5, sobreexpresada en el depósito omental, se induce con el estímulo inflamatorio y se expresa en focos de inflamación aguda en biopsias de tejido adiposo. En cuanto al estudio proteómico comparativo del depósito graso omental en individuos obesos y no obesos, los resultados

## Resultados y Discusión

han puesto en evidencia la reducción de la expresión de proteínas implicadas en procesos metabólicos en los sujetos obesos, y han mostrado que dos de estas proteínas, la TKT y la ACY-1, podrían tener un papel relevante en la fisiología del tejido adiposo en obesidad.

## 5. CONCLUSIONES

1. Este trabajo describe por primera vez la existencia de cambios en la expresión de proteínas en los depósitos grados omental y subcutáneo y en el tejido adiposo omental de individuos obesos frente a no-obesos, reflejando la existencia de alteraciones moleculares en la fisiopatología del tejido adiposo debido a la obesidad.
2. La aplicación de la técnica 2D-DIGE en combinación con la MS ha puesto de manifiesto proteínas con diferencias de expresión entre el tejido adiposo omental y el subcutáneo que reflejan una actividad metabólica y un perfil inflamatorio más acusado en el depósito omental.
3. Se ha mostrado la expresión de citoqueratinas epiteliales exclusivamente en el mesotelio del tejido adiposo omental lo que permite utilizar estas proteínas como marcadores específicos de este depósito graso.
4. Este estudio ha revelado que la proteína FABP5 se induce con estímulos inflamatorios y se expresa en los macrófagos que forman estructuras de corona alrededor de los adipocitos, localizándose en focos de inflamación aguda en el tejido adiposo.
5. La aplicación de la técnica 2D-DIGE en combinación con la MS ha revelado proteínas diferencialmente expresadas entre el tejido adiposo omental de individuos obesos y no-obesos poniendo de manifiesto una disminución de la actividad metabólica y un aumento de las proteínas relacionadas con cambios estructurales de las células en obesidad.
6. Se han identificado dos proteínas, ACY-1 y TKT, cuyos niveles de expresión están reducidos en obesidad. Ambas proteínas se inducen con la adipogénesis y migran desde el núcleo al citoplasma durante este proceso, lo que indica que podrían tener un papel relevante en la fisiología del tejido adiposo en obesidad.
7. Los niveles de expresión de la proteína HSP70 están aumentados en el tejido adiposo omental con la obesidad pero disminuyen con la aparición de la diabetes de tipo 2, lo que sugiere un papel protector de la HSP70 en el desarrollo de la patología diabética.

8. Las proteínas identificadas en este trabajo constituyen candidatos potenciales para explicar la etiología de la obesidad, dejando abiertas numerosas hipótesis que habrán de ser confirmadas mediante los correspondientes ensayos funcionales.

9. Se han identificado proteínas de referencia en el tejido adiposo humano para análisis de expresión proteica. La FAA se podrá utilizar en los estudios entre los dos depósitos grasos y la ENOA, la B-actina y la PARK7 en los análisis de expresión de proteínas del tejido adiposo omental.

## Bibliografía

- Abumrad NA, el-Maghrabi MR, Amri EZ, Lopez E, Grimaldi PA (Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J Biol Chem* 268:17665-17668.1993).
- Ahmed M, Neville MJ, Edelmann MJ, Kessler BM, Karpe F (Proteomic analysis of human adipose tissue after rosiglitazone treatment shows coordinated changes to promote glucose uptake. *Obesity (Silver Spring)* 18:27-34.2010).
- Alban A, David SO, Bjorkesten L, Andersson C, Sloge E, Lewis S, Currie I (A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics* 3:36-44.2003).
- Alvarez-Llamas G, Szalowska E, de Vries MP, Weening D, Landman K, Hoek A, Wolffenduttel BH, Roelofsen H, Vonk RJ (Characterization of the human visceral adipose tissue secretome. *Mol Cell Proteomics* 6:589-600.2007).
- Allende ML, Yamashita T, Proia RL (G-protein-coupled receptor S1P1 acts within endothelial cells to regulate vascular maturation. *Blood* 102:3665-3667.2003).
- Banerjee RR, Rangwala SM, Shapiro JS, Rich AS, Rhoades B, Qi Y, Wang J, Rajala MW, Pocai A, Scherer PE, Steppan CM, Ahima RS, Obici S, Rossetti L, Lazar MA (Regulation of fasted blood glucose by resistin. *Science* 303:1195-1198.2004).
- Barash IA, Cheung CC, Weigle DS, Ren H, Kabigting EB, Kuijper JL, Clifton DK, Steiner RA (Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology* 137:3144-3147.1996).
- Bastard JP, Grimaldi A, Jardel C, Porquet D, Bruckert E, Hainque B (A simple index of insulin resistance. *Diabetes Metab* 23:87-88.1997).
- Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D (Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 2:326-332.2000).
- Bjorntorp P ("Portal" adipose tissue as a generator of risk factors for cardiovascular disease and diabetes. *Arteriosclerosis* 10:493-496.1990).
- Bjorntorp P (Metabolic implications of body fat distribution. *Diabetes Care* 14:1132-1143.1991).
- Boden G, Duan X, Homko C, Molina EJ, Song W, Perez O, Cheung P, Merali S (Increase in endoplasmic reticulum stress-related proteins and genes in adipose tissue of obese, insulin-resistant individuals. *Diabetes* 57:2438-2444.2008).
- Boros LG, Puigjaner J, Cascante M, Lee WN, Brandes JL, Bassilian S, Yusuf FI, Williams RD, Muscarella P, Melvin WS, Schirmer WJ (Oxythiamine and dehydroepiandrosterone inhibit the nonoxidative synthesis of ribose and tumor cell proliferation. *Cancer Res* 57:4242-4248.1997).
- Bour S, Daviaud D, Gres S, Lefort C, Prevot D, Zorzano A, Wabitsch M, Saulnier-Blache JS, Valet P, Carpene C (Adipogenesis-related increase of semicarbazide-sensitive amine oxidase and monoamine oxidase in human adipocytes. *Biochimie* 89:916-925.2007).
- Bray GA (Medical consequences of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2583-2589.2004).
- Brodsky JL, Skach WR (Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum: Recent lessons from yeast and mammalian cell systems. *Curr Opin Cell Biol* 23:464-475.2011).
- Calderwood SK, Khaleque MA, Sawyer DB, Ciocca DR (Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci* 31:164-172.2006).
- Calle EE, Kaaks R (Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer* 4:579-591.2004).
- Celis JE, Moreira JM, Cabezon T, Gromov P, Friis E, Rank F, Gromova I (Identification of extracellular and intracellular signaling components of the mammary adipose tissue and its interstitial fluid in high risk breast cancer patients: toward dissecting the molecular circuitry of epithelial-adipocyte stromal cell interactions. *Mol Cell Proteomics* 4:492-522.2005).

## Bibliografía

- Cianflone K, Xia Z, Chen LY (Critical review of acylation-stimulating protein physiology in humans and rodents. *Biochim Biophys Acta* 1609:127-143.2003).
- Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloria 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).
- Clough T, Braun S, Fokin V, Ott I, Ragg S, Schadow G, Vitek O (Statistical design and analysis of label-free LC-MS proteomic experiments: a case study of coronary artery disease. *Methods Mol Biol* 728:293-319.2011).
- Coe NR, Simpson MA, Bernlohr DA (Targeted disruption of the adipocyte lipid-binding protein (aP2 protein) gene impairs fat cell lipolysis and increases cellular fatty acid levels. *J Lipid Res* 40:967-972.1999).
- Corton M, Botella-Carretero JI, Lopez JA, Camafeita E, San Millan JL, Escobar-Morreale HF, Peral B (Proteomic analysis of human omental adipose tissue in the polycystic ovary syndrome using two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Hum Reprod* 23:651-661.2008).
- Corton M, Villuendas G, Botella JI, San Millan JL, Escobar-Morreale HF, Peral B (Improved resolution of the human adipose tissue proteome at alkaline and wide range pH by the addition of hydroxyethyl disulfide. *Proteomics* 4:438-441.2004).
- Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T, Henry RR (Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care* 26:2442-2450.2003).
- Chen G, Gharib TG, Huang CC, Taylor JM, Misek DE, Kardia SL, Giordano TJ, Iannettoni MD, Orringer MB, Hanash SM, Beer DG (Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Mol Cell Proteomics* 1:304-313.2002).
- Cheyssac C, Dina C, Lepretre F, Vasseur-Delannoy V, Dechaume A, Lobbens S, Balkau B, Ruiz J, Charpentier G, Pattou F, Joly E, Prentki M, Hansen T, Pedersen O, Vaxillaire M, Froguel P (EIF4A2 is a positional candidate gene at the 3q27 locus linked to type 2 diabetes in French families. *Diabetes* 55:1171-1176.2006).
- Cho RJ, Campbell MJ (Transcription, genomes, function. *Trends Genet* 16:409-415.2000).
- Chouchane L, Danguir J, Beji C, Bouassida K, Camoin L, Sfar H, Gabbouj S, Strosberg AD (Genetic variation in the stress protein hsp70-2 gene is highly associated with obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25:462-466.2001).
- Chung J, Nguyen AK, Henstridge DC, Holmes AG, Chan MH, Mesa JL, Lancaster GI, Southgate RJ, Bruce CR, Duffy SJ, Horvath I, Mestril R, Watt MJ, Hooper PL, Kingwell BA, Vigh L, Hevener A, Febbraio MA (HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:1739-1744.2008).
- Daniels SR, Jacobson MS, McCrindle BW, Eckel RH, Sanner BM (American Heart Association Childhood Obesity Research Summit Report. *Circulation* 119:e489-517.2009).
- Darimont C, Avanti O, Blancher F, Wagniere S, Mansourian R, Zbinden I, Leone-Vautravers P, Fuerholz A, Giusti V, Mace K (Contribution of mesothelial cells in the expression of inflammatory-related factors in omental adipose tissue of obese subjects. *Int J Obes (Lond)* 32:112-120.2008).
- del Pozo CH, Calvo RM, Vesperinas-Garcia G, Gomez-Ambrosi J, Fruhbeck G, Rubio MA, Obregon MJ (Expression profile in omental and subcutaneous adipose tissue from lean and obese subjects. Repression of lipolytic and lipogenic genes. *Obes Surg* 21:633-643.2011).
- DeLany JP, Floyd ZE, Zvonic S, Smith A, Gravos A, Reiners E, Wu X, Kilroy G, Lefevre M, Gimble JM (Proteomic analysis of primary cultures of human adipose-derived stem cells: modulation by Adipogenesis. *Mol Cell Proteomics* 4:731-740.2005).
- Di Marzo V, Matias I (Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nat Neurosci* 8:585-589.2005).
- Diez JJ, Iglesias P (The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur J Endocrinol* 148:293-300.2003).

- Dubois SG, Heilbronn LK, Smith SR, Albu JB, Kelley DE, Ravussin E (Decreased expression of adipogenic genes in obese subjects with type 2 diabetes. *Obesity (Silver Spring)* 14:1543-1552.2006).
- Duester G, Mic FA, Molotkov A (Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissue-specific metabolism to retinoic acid. *Chem Biol Interact* 143-144:201-210.2003).
- Esteve E, Ricart W, Fernandez-Real JM (Adipocytokines and insulin resistance: the possible role of lipocalin-2, retinol binding protein-4, and adiponectin. *Diabetes Care* 32 Suppl 2:S362-367.2009).
- Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW (Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 145:2273-2282.2004).
- Felson DT, Anderson JJ, Naimark A, Walker AM, Meenan RF (Obesity and knee osteoarthritis. The Framingham Study. *Ann Intern Med* 109:18-24.1988).
- Feo S, Arcuri D, Piddini E, Passantino R, Giallongo A (ENO1 gene product binds to the c-myc promoter and acts as a transcriptional repressor: relationship with Myc promoter-binding protein 1 (MBP-1). *FEBS Lett* 473:47-52.2000).
- Fernandez-Real JM, Ricart W (Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocr Rev* 24:278-301.2003).
- Flier JS (Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell* 116:337-350.2004).
- Flier JS, Cook KS, Usher P, Spiegelman BM (Severely impaired adiponectin expression in genetic and acquired obesity. *Science* 237:405-408.1987).
- Fox CS, Massaro JM, Hoffmann U, Pou KM, Maurovich-Horvat P, Liu CY, Vasan RS, Murabito JM, Meigs JB, Cupples LA, D'Agostino RB, Sr., O'Donnell CJ (Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation* 116:39-48.2007).
- Frayn KN, Karpe F, Fielding BA, Macdonald IA, Coppock SW (Integrative physiology of human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27:875-888.2003).
- Furuhashi M, Fuchio R, Gorgun CZ, Tuncman G, Cao H, Hotamisligil GS (Adipocyte/macrophage fatty acid-binding proteins contribute to metabolic deterioration through actions in both macrophages and adipocytes in mice. *J Clin Invest* 118:2640-2650.2008).
- Gabrielsson BG, Johansson JM, Lonn M, Jernas M, Olbers T, Peltonen M, Larsson I, Lonn L, Sjostrom L, Carlsson B, Carlsson LM (High expression of complement components in omental adipose tissue in obese men. *Obes Res* 11:699-708.2003).
- Gesta S, Bluher M, Yamamoto Y, Norris AW, Berndt J, Kralisch S, Boucher J, Lewis C, Kahn CR (Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:6676-6681.2006).
- Giusti V, Verdumo C, Suter M, Gaillard RC, Burckhardt P, Pralong F (Expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma1 and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 in visceral and subcutaneous adipose tissue of obese women. *Diabetes* 52:1673-1676.2003).
- Gomez-Ambrosi J, Catalan V, Diez-Caballero A, Martinez-Cruz LA, Gil MJ, Garcia-Foncillas J, Cienfuegos JA, Salvador J, Mato JM, Fruhbeck G (Gene expression profile of omental adipose tissue in human obesity. *FASEB J* 18:215-217.2004).
- Gregor MF, Yang L, Fabbrini E, Mohammed BS, Eagon JC, Hotamisligil GS, Klein S (Endoplasmic reticulum stress is reduced in tissues of obese subjects after weight loss. *Diabetes* 58:693-700.2009).
- Griffin TJ, Gygi SP, Ideker T, Rist B, Eng J, Hood L, Aebersold R (Complementary profiling of gene expression at the transcriptome and proteome levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Proteomics* 1:323-333.2002).

## Bibliografía

- Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP (Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:367-377.2008).
- Gupte AA, Bomhoff GL, Swerdlow RH, Geiger PC (Heat treatment improves glucose tolerance and prevents skeletal muscle insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *Diabetes* 58:567-578.2009).
- Hammes HP, Du X, Edelstein D, Taguchi T, Matsumura T, Ju Q, Lin J, Bierhaus A, Nawroth P, Hannak D, Neumaier M, Bergfeld R, Giardino I, Brownlee M (Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. *Nat Med* 9:294-299.2003).
- Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D (Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell* 5:897-904.2000).
- Hashimoto T, Igashira J, Kosaka H (Sphingosine kinase is induced in mouse 3T3-L1 cells and promotes adipogenesis. *J Lipid Res* 50:602-610.2009).
- Haslam DW, James WP (Obesity. *Lancet* 366:1197-1209.2005).
- Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K (Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* 10:3787-3799.1999).
- Hellmer J, Marcus C, Sonnenfeld T, Arner P (Mechanisms for differences in lipolysis between human subcutaneous and omental fat cells. *J Clin Endocrinol Metab* 75:15-20.1992).
- Henegar C, Tordjman J, Achard V, Lacasa D, Cremer I, Guerre-Millo M, Poitou C, Basdevant A, Stich V, Viguerie N, Langin D, Bedossa P, Zucker JD, Clement K (Adipose tissue transcriptomic signature highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity. *Genome Biol* 9:R14.2008).
- Hertzel AV, Bennaars-Eiden A, Bernlohr DA (Increased lipolysis in transgenic animals overexpressing the epithelial fatty acid binding protein in adipose cells. *J Lipid Res* 43:2105-2111.2002).
- Holness CL, Simmons DL (Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood* 81:1607-1613.1993).
- Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM (Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259:87-91.1993).
- Hu E, Liang P, Spiegelman BM (AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 271:10697-10703.1996).
- Hu P, Han Z, Couvillon AD, Kaufman RJ, Exton JH (Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1alpha-mediated NF-kappaB activation and down-regulation of TRAF2 expression. *Mol Cell Biol* 26:3071-3084.2006).
- Hurtado del Pozo C, Calvo RM, Vesperinas-Garcia G, Gomez-Ambrosi J, Fruhbeck G, Corripio-Sanchez R, Rubio MA, Obregon MJ (IPO8 and FBXL10: new reference genes for gene expression studies in human adipose tissue. *Obesity (Silver Spring)* 18:897-903.2010).
- Hwang BJ, Liao JC, Chu G (Isolation of a cDNA encoding a UV-damaged DNA binding factor defective in xeroderma pigmentosum group E cells. *Mutat Res* 362:105-117.1996).
- Juhan-Vague I, Alessi MC, Mavri A, Morange PE (Plasminogen activator inhibitor-1, inflammation, obesity, insulin resistance and vascular risk. *J Thromb Haemost* 1:1575-1579.2003).
- Kaaman M, Sparks LM, van Harmelen V, Smith SR, Sjolin E, Dahlman I, Arner P (Strong association between mitochondrial DNA copy number and lipogenesis in human white adipose tissue. *Diabetologia* 50:2526-2533.2007).
- Kahle PJ, Waak J, Gasser T (DJ-1 and prevention of oxidative stress in Parkinson's disease and other age-related disorders. *Free Radic Biol Med* 47:1354-1361.2009).
- Keeney S, Eker AP, Brody T, Vermeulen W, Bootsma D, Hoeijmakers JH, Linn S (Correction of the DNA repair defect in xeroderma pigmentosum group E by injection of a DNA damage-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:4053-4056.1994).

- Kheterpal I, Ku G, Coleman L, Yu G, Ptitsyn AA, Floyd ZE, Gimble JM (Proteome of Human Subcutaneous Adipose Tissue Stromal Vascular Fraction Cells versus Mature Adipocytes Based on DIGE. *J Proteome Res* 10:1519-1527.2011).
- Kim J, Choi YS, Lim S, Yea K, Yoon JH, Jun DJ, Ha SH, Kim JW, Kim JH, Suh PG, Ryu SH, Lee TG (Comparative analysis of the secretory proteome of human adipose stromal vascular fraction cells during adipogenesis. *Proteomics* 10:394-405.2010).
- Klimcakova E, Roussel B, Marquez-Quinones A, Kovacova Z, Kovacikova M, Combes M, Siklova-Vitkova M, Hejnova J, Sramkova P, Bouloumié A, Viguerie N, Stich V, Langin D (Worsening of obesity and metabolic status yields similar molecular adaptations in human subcutaneous and visceral adipose tissue: decreased metabolism and increased immune response. *J Clin Endocrinol Metab* 96:E73-82.2011).
- Klating N, Graham TE, Berndt J, Kralisch S, Kovacs P, Wason CJ, Fasshauer M, Schon MR, Stumvoll M, Bluher M, Kahn BB (Serum retinol-binding protein is more highly expressed in visceral than in subcutaneous adipose tissue and is a marker of intra-abdominal fat mass. *Cell Metab* 6:79-87.2007).
- Koh EH, Park JY, Park HS, Jeon MJ, Ryu JW, Kim M, Kim SY, Kim MS, Kim SW, Park IS, Youn JH, Lee KU (Essential role of mitochondrial function in adiponectin synthesis in adipocytes. *Diabetes* 56:2973-2981.2007).
- Kovsan J, Bluher M, Tarnovscki T, Klating N, Kirshtein B, Madar L, Shai I, Golan R, Harman-Boehm I, Schon MR, Greenberg AS, Elazar Z, Bashan N, Rudich A (Altered autophagy in human adipose tissues in obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 96:E268-277.2011).
- Kurucz I, Morva A, Vaag A, Eriksson KF, Huang X, Groop L, Koranyi L (Decreased expression of heat shock protein 72 in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes correlates with insulin resistance. *Diabetes* 51:1102-1109.2002).
- Lancerotto L, Stecco C, Macchi V, Porzionato A, Stecco A, De Caro R (Layers of the abdominal wall: anatomical investigation of subcutaneous tissue and superficial fascia. *Surg Radiol Anat* 33:835-842.2011).
- Lanneau D, Brunet M, Frisan E, Solary E, Fontenay M, Garrido C (Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *J Cell Mol Med* 12:743-761.2008).
- Large V, Reynisdottir S, Langin D, Fredby K, Klannemark M, Holm C, Arner P (Decreased expression and function of adipocyte hormone-sensitive lipase in subcutaneous fat cells of obese subjects. *J Lipid Res* 40:2059-2066.1999).
- Lee AS (Mammalian stress response: induction of the glucose-regulated protein family. *Curr Opin Cell Biol* 4:267-273.1992).
- Lee PS, Shaw LB, Choe LH, Mehra A, Hatzimanikatis V, Lee KH (Insights into the relation between mRNA and protein expression patterns: II. Experimental observations in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 84:834-841.2003).
- Lefebvre AM, Laville M, Vega N, Riou JP, van Gaal L, Auwerx J, Vidal H (Depot-specific differences in adipose tissue gene expression in lean and obese subjects. *Diabetes* 47:98-103.1998).
- Linder K, Arner P, Flores-Morales A, Tollet-Egnell P, Norstedt G (Differentially expressed genes in visceral or subcutaneous adipose tissue of obese men and women. *J Lipid Res* 45:148-154.2004).
- Liu S, Yang Z, Wei H, Shen W, Liu J, Yin Q, Li X, Yi J (Increased DJ-1 and its prognostic significance in hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 57:1247-1256.2010).
- Lopez-Alemany R, Longstaff C, Hawley S, Mirshahi M, Fabregas P, Jardi M, Merton E, Miles LA, Felez J (Inhibition of cell surface mediated plasminogen activation by a monoclonal antibody against alpha-Enolase. *Am J Hematol* 72:234-242.2003).
- Lu P, Vogel C, Wang R, Yao X, Marcotte EM (Absolute protein expression profiling estimates the relative contributions of transcriptional and translational regulation. *Nat Biotechnol* 25:117-124.2007).

## Bibliografía

- Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR (Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 117:175-184.2007).
- Maceyka M, Nava VE, Milstien S, Spiegel S (Aminoacylase 1 is a sphingosine kinase 1-interacting protein. *FEBS Lett* 568:30-34.2004).
- MacLaren R, Cui W, Simard S, Cianflone K (Influence of obesity and insulin sensitivity on insulin signaling genes in human omental and subcutaneous adipose tissue. *J Lipid Res* 49:308-323.2008).
- Maeda K, Cao H, Kono K, Gorgun CZ, Furuhashi M, Uysal KT, Cao Q, Atsumi G, Malone H, Krishnan B, Minokoshi Y, Kahn BB, Parker RA, Hotamisligil GS (Adipocyte/macrophage fatty acid binding proteins control integrated metabolic responses in obesity and diabetes. *Cell Metab* 1:107-119.2005).
- Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K (cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun* 221:286-289.1996).
- Maeda K, Uysal KT, Makowski L, Gorgun CZ, Atsumi G, Parker RA, Bruning J, Hertzel AV, Bernlohr DA, Hotamisligil GS (Role of the fatty acid binding protein mal1 in obesity and insulin resistance. *Diabetes* 52:300-307.2003).
- Makowski L, Boord JB, Maeda K, Babaev VR, Uysal KT, Morgan MA, Parker RA, Suttles J, Fazio S, Hotamisligil GS, Linton MF (Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis. *Nat Med* 7:699-705.2001).
- Mandl J, Meszaros T, Banhegyi G, Hunyady L, Csala M (Endoplasmic reticulum: nutrient sensor in physiology and pathology. *Trends Endocrinol Metab* 20:194-201.2009).
- Marcu MG, Doyle M, Bertolotti A, Ron D, Hendershot L, Neckers L (Heat shock protein 90 modulates the unfolded protein response by stabilizing IRE1alpha. *Mol Cell Biol* 22:8506-8513.2002).
- Margetic S, Gazzola C, Pegg GG, Hill RA (Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26:1407-1433.2002).
- Marin P, Andersson B, Ottosson M, Olbe L, Chowdhury B, Kvist H, Holm G, Sjostrom L, Bjorntorp P (The morphology and metabolism of intraabdominal adipose tissue in men. *Metabolism* 41:1242-1248.1992).
- Marrades MP, Gonzalez-Muniesa P, Arteta D, Martinez JA, Moreno-Aliaga MJ (Orchestrated downregulation of genes involved in oxidative metabolic pathways in obese vs. lean high-fat young male consumers. *J Physiol Biochem*.2010).
- Massiera F, Bloch-Faure M, Ceiler D, Murakami K, Fukamizu A, Gasc JM, Quignard-Boulange A, Negrel R, Ailhaud G, Seydoux J, Meneton P, Teboul M (Adipose angiotensinogen is involved in adipose tissue growth and blood pressure regulation. *FASEB J* 15:2727-2729.2001).
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC (Homeostasis model assessment: insulin resistance and β-cell function from fasting plasma insulin and glucose concentrations in man. *Diabetologia* 28:412-419.1985).
- McQuaid SE, Hodson L, Neville MJ, Dennis AL, Cheeseman J, Humphreys SM, Ruge T, Gilbert M, Fielding BA, Frayn KN, Karpe F (Downregulation of adipose tissue fatty acid trafficking in obesity: a driver for ectopic fat deposition? *Diabetes* 60:47-55.2011).
- Mertens I, Van Gaal LF (Obesity, haemostasis and the fibrinolytic system. *Obes Rev* 3:85-101.2002).
- Miller YE, Minna JD, Gazdar AF (Lack of expression of aminoacylase-1 in small cell lung cancer. Evidence for inactivation of genes encoded by chromosome 3p. *J Clin Invest* 83:2120-2124.1989).
- Montague CT, O'Rahilly S (The perils of portliness: causes and consequences of visceral adiposity. *Diabetes* 49:883-888.2000).

- Montague CT, Prins JB, Sanders L, Digby JE, O'Rahilly S (Depot- and sex-specific differences in human leptin mRNA expression: implications for the control of regional fat distribution. *Diabetes* 46:342-347.1997).
- Moustaid N, Jones BH, Taylor JW (Insulin increases lipogenic enzyme activity in human adipocytes in primary culture. *J Nutr* 126:865-870.1996).
- Nadler ST, Stoehr JP, Schueler KL, Tanimoto G, Yandell BS, Attie AD (The expression of adipogenic genes is decreased in obesity and diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11371-11376.2000).
- Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, Mazda T, Tomita M (Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem* 120:803-812.1996).
- Neel JV (Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *Am J Hum Genet* 14:353-362.1962).
- Neels JG, Olefsky JM (Inflamed fat: what starts the fire? *J Clin Invest* 116:33-35.2006).
- Nishitani H, Sugimoto N, Roukos V, Nakanishi Y, Saijo M, Obuse C, Tsurimoto T, Nakayama KI, Nakayama K, Fujita M, Lygerou Z, Nishimoto T (Two E3 ubiquitin ligases, SCF-Skp2 and DDB1-Cul4, target human Cdt1 for proteolysis. *EMBO J* 25:1126-1136.2006).
- Ochi H, Horiuchi I, Araki N, Toda T, Araki T, Sato K, Murai H, Osoegawa M, Yamada T, Okamura K, Ogino T, Mizumoto K, Yamashita H, Saya H, Kira J (Proteomic analysis of human brain identifies alpha-enolase as a novel autoantigen in Hashimoto's encephalopathy. *FEBS Lett* 528:197-202.2002).
- Orntoft TF, Thykjaer T, Waldman FM, Wolf H, Celis JE (Genome-wide study of gene copy numbers, transcripts, and protein levels in pairs of non-invasive and invasive human transitional cell carcinomas. *Mol Cell Proteomics* 1:37-45.2002).
- Ortega FJ, Mayas D, Moreno-Navarrete JM, Catalan V, Gomez-Ambrosi J, Esteve E, Rodriguez-Hermosa JI, Ruiz B, Ricart W, Peral B, Frühbeck G, Tinahones FJ, Fernandez-Real JM (The gene expression of the main lipogenic enzymes is downregulated in visceral adipose tissue of obese subjects. *Obesity (Silver Spring)* 18:13-20.2010).
- Owens DW, Lane EB (The quest for the function of simple epithelial keratins. *Bioessays* 25:748-758.2003).
- Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Gorgun C, Glimcher LH, Hotamisligil GS (Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 306:457-461.2004).
- Paoletti F, Mocali A, Tombaccini D (Cysteine proteinases are responsible for characteristic transketolase alterations in Alzheimer fibroblasts. *J Cell Physiol* 172:63-68.1997).
- Patti ME, Corvera S (The role of mitochondria in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 31:364-395.2010).
- Peinado JR, Jimenez-Gomez Y, Pulido MR, Ortega-Bellido M, Diaz-Lopez C, Padillo FJ, Lopez-Miranda J, Vazquez-Martinez R, Malagon MM (The stromal-vascular fraction of adipose tissue contributes to major differences between subcutaneous and visceral fat depots. *Proteomics* 10:3356-3366.2010).
- Peral B, Camafeita E, Fernandez-Real JM, Lopez JA (Tackling the human adipose tissue proteome to gain insight into obesity and related pathologies. *Expert Rev Proteomics* 6:353-361.2009).
- Perez-Perez R, Garcia-Santos E, Ortega-Delgado FJ, Lopez JA, Camafeita E, Ricart W, Fernandez-Real JM, Peral B (Attenuated metabolism is a hallmark of obesity as revealed by comparative proteomic analysis of human omental adipose tissue. *J Proteomics* 75:783-795.2012a).
- Perez-Perez R, Lopez JA, Garcia-Santos E, Camafeita E, Gomez-Serrano M, Ortega-Delgado FJ, Ricart W, Fernandez-Real JM, Peral B (Uncovering suitable reference proteins for expression studies in human adipose tissue with relevance to obesity. *PLoS One* 7:e30326.2012b).

## Bibliografía

- Perez-Perez R, Ortega-Delgado FJ, Garcia-Santos E, Lopez JA, Camafeita E, Ricart W, Fernandez-Real JM, Peral B (Differential proteomics of omental and subcutaneous adipose tissue reflects their unalike biochemical and metabolic properties. *J Proteome Res* 8:1682-1693.2009).
- Pham TV, Piersma SR, Warmoes M, Jimenez CR (On the beta-binomial model for analysis of spectral count data in label-free tandem mass spectrometry-based proteomics. *Bioinformatics* 26:363-369.2010).
- Pizzinat N, Marti L, Remaury A, Leger F, Langin D, Lafontan M, Carpene C, Parini A (High expression of monoamine oxidases in human white adipose tissue: evidence for their involvement in noradrenaline clearance. *Biochem Pharmacol* 58:1735-1742.1999).
- Poussin C, Hall D, Minehira K, Galzin AM, Tarussio D, Thorens B (Different transcriptional control of metabolism and extracellular matrix in visceral and subcutaneous fat of obese and rimonabant treated mice. *PLoS One* 3:e3385.2008).
- Qiao Q, Nyamdorj R (Is the association of type II diabetes with waist circumference or waist-to-hip ratio stronger than that with body mass index? *Eur J Clin Nutr* 64:30-34.2010).
- Rai P, Shivaji S (The role of DJ-1 in the pathogenesis of endometriosis. *PLoS One* 6:e18074.2011).
- Rajala MW, Obici S, Scherer PE, Rossetti L (Adipose-derived resistin and gut-derived resistin-like molecule-beta selectively impair insulin action on glucose production. *J Clin Invest* 111:225-230.2003).
- Ravussin E, Galgani JE (The Implication of Brown Adipose Tissue for Humans. *Annu Rev Nutr.*2010).
- Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M (Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* 371:569-578.2008).
- Rong JX, Qiu Y, Hansen MK, Zhu L, Zhang V, Xie M, Okamoto Y, Mattie MD, Higashiyama H, Asano S, Strum JC, Ryan TE (Adipose mitochondrial biogenesis is suppressed in db/db and high-fat diet-fed mice and improved by rosiglitazone. *Diabetes* 56:1751-1760.2007).
- Roytblat L, Rachinsky M, Fisher A, Greemberg L, Shapira Y, Douvdevani A, Gelman S (Raised interleukin-6 levels in obese patients. *Obes Res* 8:673-675.2000).
- Ruan H, Miles PD, Ladd CM, Ross K, Golub TR, Olefsky JM, Lodish HF (Profiling gene transcription in vivo reveals adipose tissue as an immediate target of tumor necrosis factor-alpha: implications for insulin resistance. *Diabetes* 51:3176-3188.2002).
- Rytka JM, Wueest S, Schoenle EJ, Konrad D (The portal theory supported by venous drainage-selective fat transplantation. *Diabetes* 60:56-63.2011).
- Sartipy P, Loskutoff DJ (Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7265-7270.2003).
- Sass JO, Mohr V, Olbrich H, Engelke U, Horvath J, Fliegauf M, Loges NT, Schweitzer-Krantz S, Moebus R, Weiler P, Kispert A, Superti-Furga A, Wevers RA, Omran H (Mutations in ACY1, the gene encoding aminoacylase 1, cause a novel inborn error of metabolism. *Am J Hum Genet* 78:401-409.2006).
- Sax CM, Salomon C, Kays WT, Guo J, Yu FX, Cuthbertson RA, Piatigorsky J (Transketolase is a major protein in the mouse cornea. *J Biol Chem* 271:33568-33574.1996).
- Sbarbati A, Accorsi D, Benati D, Marchetti L, Orsini G, Rigotti G, Panettiere P (Subcutaneous adipose tissue classification. *Eur J Histochem* 54:e48.2010).
- Schenk G, Duggleby RG, Nixon PF (Properties and functions of the thiamin diphosphate dependent enzyme transketolase. *Int J Biochem Cell Biol* 30:1297-1318.1998).
- Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF (A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 270:26746-26749.1995).

- Schug TT, Berry DC, Shaw NS, Travis SN, Noy N (Opposing effects of retinoic acid on cell growth result from alternate activation of two different nuclear receptors. *Cell* 129:723-733.2007).
- Schwanhausser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, Chen W, Selbach M (Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473:337-342.2011).
- Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Zimmers TA, Koniaris LG, Furlanetto RW, Mooney RA (Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. *J Biol Chem* 278:13740-13746.2003).
- Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M (In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* 1:2856-2860.2006).
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M (Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68:850-858.1996).
- Shi X, Burkart A, Nicoloro SM, Czech MP, Straubhaar J, Corvera S (Paradoxical effect of mitochondrial respiratory chain impairment on insulin signaling and glucose transport in adipose cells. *J Biol Chem* 283:30658-30667.2008).
- Siiteri PK (Adipose tissue as a source of hormones. *Am J Clin Nutr* 45:277-282.1987).
- Simpson MA, LiCata VJ, Ribarik Coe N, Bernlohr DA (Biochemical and biophysical analysis of the intracellular lipid binding proteins of adipocytes. *Mol Cell Biochem* 192:33-40.1999).
- Snijder MB, Dekker JM, Visser M, Bouter LM, Stehouwer CD, Kostense PJ, Yudkin JS, Heine RJ, Nijpels G, Seidell JC (Associations of hip and thigh circumferences independent of waist circumference with the incidence of type 2 diabetes: the Hoorn Study. *Am J Clin Nutr* 77:1192-1197.2003).
- Soukas A, Cohen P, Socci ND, Friedman JM (Leptin-specific patterns of gene expression in white adipose tissue. *Genes Dev* 14:963-980.2000).
- Spiegelman BM, Flier JS (Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 104:531-543.2001).
- Spoto B, Fezza F, Parlongo G, Battista N, Sgro E, Gasperi V, Zoccali C, Maccarrone M (Human adipose tissue binds and metabolizes the endocannabinoids anandamide and 2-arachidonoylglycerol. *Biochimie* 88:1889-1897.2006).
- Starowicz KM, Cristino L, Matias I, Capasso R, Racioppi A, Izzo AA, Di Marzo V (Endocannabinoid dysregulation in the pancreas and adipose tissue of mice fed with a high-fat diet. *Obesity (Silver Spring)* 16:553-565.2008).
- Sumanasekera WK, Tien ES, Turpey R, Vanden Heuvel JP, Perdew GH (Evidence that peroxisome proliferator-activated receptor alpha is complexed with the 90-kDa heat shock protein and the hepatitis virus B X-associated protein 2. *J Biol Chem* 278:4467-4473.2003).
- Sun J, Liao JK (Induction of angiogenesis by heat shock protein 90 mediated by protein kinase Akt and endothelial nitric oxide synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:2238-2244.2004).
- Tanguay RM, Valet JP, Lescault A, Duband JL, Laberge C, Lettre F, Plante M (Different molecular basis for fumarylacetacetate hydrolase deficiency in the two clinical forms of hereditary tyrosinemia (type I). *Am J Hum Genet* 47:308-316.1990).
- Tirasophon W, Welihinda AA, Kaufman RJ (A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes Dev* 12:1812-1824.1998).
- Tran TT, Yamamoto Y, Gesta S, Kahn CR (Beneficial effects of subcutaneous fat transplantation on metabolism. *Cell Metab* 7:410-420.2008).
- Unger RH (Lipotoxic diseases. *Annu Rev Med* 53:319-336.2002).
- Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, Ron D (Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 287:664-666.2000).

## Bibliografía

- van Beek EA, Bakker AH, Kruyt PM, Hofker MH, Saris WH, Keijer J (Intra- and interindividual variation in gene expression in human adipose tissue. *Pflugers Arch* 453:851-861.2007).
- Van Coster RN, Gerlo EA, Giardina TG, Engelke UF, Smet JE, De Praeter CM, Meersschaut VA, De Meirlier LJ, Seneca SH, Devreese B, Leroy JG, Herga S, Perrier JP, Wevers RA, Lissens W (Aminoacylase I deficiency: a novel inborn error of metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 338:1322-1326.2005).
- van Hinsbergh VW, Kooistra T, Scheffer MA, Hajo van Bockel J, van Muijen GN (Characterization and fibrinolytic properties of human omental tissue mesothelial cells. Comparison with endothelial cells. *Blood* 75:1490-1497.1990).
- Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, Taittonen M, Laine J, Savisto NJ, Enerback S, Nuutila P (Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med* 360:1518-1525.2009).
- Visentin V, Prevot D, De Saint Front VD, Morin-Cussac N, Thalamas C, Galitzky J, Valet P, Zorzano A, Carpene C (Alteration of amine oxidase activity in the adipose tissue of obese subjects. *Obes Res* 12:547-555.2004).
- Vohl MC, Sladek R, Robitaille J, Gurd S, Marceau P, Richard D, Hudson TJ, Tchernof A (A survey of genes differentially expressed in subcutaneous and visceral adipose tissue in men. *Obes Res* 12:1217-1222.2004).
- Wajchenberg BL (Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 21:697-738.2000).
- Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, Vaddi K, Charo I, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. (CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest* 116:115-124.2006).
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. (Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112:1796-1808.2003).
- Welborn TA, Dhaliwal SS (Preferred clinical measures of central obesity for predicting mortality. *Eur J Clin Nutr* 61:1373-1379.2007).
- Wilkosz S, Ireland G, Khwaja N, Walker M, Butt R, de Giorgio-Miller A, Herrick SE (A comparative study of the structure of human and murine greater omentum. *Anat Embryol (Berl)* 209:251-261.2005).
- Wilson-Fritch L, Nicoloro S, Chouinard M, Lazar MA, Chui PC, Leszyk J, Straubhaar J, Czech MP, Corvera S (Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone. *J Clin Invest* 114:1281-1289.2004).
- Wu X, Hoffstedt J, Deeb W, Singh R, Sedkova N, Zilberman A, Zhu L, Park PK, Arner P, Goldstein BJ (Depot-specific variation in protein-tyrosine phosphatase activities in human omental and subcutaneous adipose tissue: a potential contribution to differential insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5973-5980.2001).
- Xu ZP, Wawrousek EF, Piatigorsky J (Transketolase haploinsufficiency reduces adipose tissue and female fertility in mice. *Mol Cell Biol* 22:6142-6147.2002).
- Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadokawa T (Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423:762-769.2003).
- Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny JM, Kotani K, Quadro L, Kahn BB (Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 436:356-362.2005).
- Young JC, Agashe VR, Siegers K, Hartl FU (Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:781-791.2004).

- Zhang K, Kaufman RJ (From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* 454:455-462.2008).
- 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).
- Zhong Y, Onuki J, Yamasaki T, Ogawa O, Akatsuka S, Toyokuni S (Genome-wide analysis identifies a tumor suppressor role for aminoacylase 1 in iron-induced rat renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* 30:158-164.2009).
- Ziouzenkova O, Orasanu G, Sharlach M, Akiyama TE, Berger JP, Viereck J, Hamilton JA, Tang G, Dolnikowski GG, Vogel S, Duester G, Plutzky J (Retinaldehyde represses adipogenesis and diet-induced obesity. *Nat Med* 13:695-702.2007).
- Zouari Bouassida K, Chouchane L, Jellouli K, Cherif S, Haddad S, Gabbouj S, Danguir J (Polymorphism of stress protein HSP70-2 gene in Tunisians: susceptibility implications in type 2 diabetes and obesity. *Diabetes Metab* 30:175-180.2004).
- Zvonic S, Lefevre M, Kilroy G, Floyd ZE, DeLany JP, Kheterpal I, Gravois A, Dow R, White A, Wu X, Gimble JM (Secretome of primary cultures of human adipose-derived stem cells: modulation of serpins by adipogenesis. *Mol Cell Proteomics* 6:18-28.2007).

# **Publicaciones**

El trabajo desarrollado durante esta Tesis Doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

1. Differential Proteomics of Omental and Subcutaneous Adipose Tissue Reflects Their Unalike Biochemical and Metabolic Properties. **Rafael Pérez-Pérez**, Francisco J. Ortega-Delgado, Eva García-Santos, Juan A. López, Emilio Camafeita, Wifredo Ricart, José-Manuel Fernández-Real and Belén Peral. *J Proteome Res.* 2009 Apr; 8(4):1682-93.
2. Decreased *STAMP2* expression in association with visceral adipose tissue dysfunction. José María Moreno-Navarrete, Francisco Ortega, Marta Serrano, **Rafael Pérez-Pérez**, Mónica Sabater, Wifredo Ricart, Francisco Tinahones, Belén Peral, and José Manuel Fernández-Real. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 Nov; 96(11):1816-25.
3. Attenuated metabolism is a hallmark of obesity as revealed by comparative proteomic analysis of human omental adipose tissue. **Rafael Pérez-Pérez**, Eva García-Santos, Francisco J. Ortega-Delgado, Juan A. López, Emilio Camafeita, Wifredo Ricart, José-Manuel Fernández-Real, and Belén Peral. *Journal of Proteomics*, 2012 Jan; (75): 783-95.
4. Uncovering suitable reference proteins for expression studies in human adipose tissue with relevance to obesity. **Rafael Pérez-Pérez**, Juan A. López, Eva García-Santos, Emilio Camafeita, María Gómez-Serrano, Francisco J. Ortega-Delgado, Wifredo Ricart, José-Manuel Fernández-Real, and Belén Peral. *PLoS ONE* 7(1): e30326. \*doi:10.1371/journal.pone.0030326

A continuación se adjuntan los tres artículos publicados que recogen los resultados de la presente Tesis Doctoral.

## Differential Proteomics of Omental and Subcutaneous Adipose Tissue Reflects Their Unalike Biochemical and Metabolic Properties

Rafael Pérez-Pérez,<sup>†</sup> Francisco J. Ortega-Delgado,<sup>‡</sup> Eva García-Santos,<sup>†</sup> Juan A. López,<sup>§</sup>  
Emilio Camafeita,<sup>§</sup> Wifredo Ricart,<sup>‡</sup> José-Manuel Fernández-Real,<sup>‡</sup> and Belén Peral\*,<sup>†</sup>

*Instituto de Investigaciones Biomédicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas & Universidad Autónoma de Madrid, E-28029 Madrid, Spain, Department of Diabetes, Endocrinology and Nutrition, and CIBEROBN Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Hospital Dr. Josep Trueta, E-17007 Girona, Spain, Unidad de Proteómica, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), E-28029 Madrid, Spain*

Received November 3, 2008

Obesity is increasing exponentially in developed countries and constitutes a public health problem by enhancing the risk for metabolic disorder and cardiovascular disease. Differences in gene expression profiles and in metabolic and biochemical properties have been well-described between omental and subcutaneous adipose tissue in humans. Because omental adipose tissue has been strongly associated with the development of insulin resistance, type 2 diabetes and cardiovascular disease, we searched for proteins differentially expressed in these two fat depots using two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis (2D-DIGE) and mass spectrometry (MS). In this analysis, we found 43 proteins, several of which were validated by immunoblotting and immunostaining analyses. Results demonstrated tissue-specific molecular differences in the protein makeup of the two analyzed fat depots mainly related to metabolic processes such as glucose and lipid metabolism, lipid transport, protein synthesis, protein folding, response to stress and inflammation. This suggests higher metabolic activity as well as increased cell stress in the omental compared to the subcutaneous fat. These findings provide some insights into the role of omental fat in abdominal obesity-associated co-morbidities.

**Keywords:** obesity • adipose tissue • omental fat • subcutaneous fat • mesothelial cells • metabolic syndrome • 2D-DIGE • proteomics • MALDI-TOF/TOF

### Introduction

The incidence of obesity worldwide has increased drastically during recent decades. Consequently, obesity and related disorders now constitute a serious threat to the current and future health of all populations. The adipose tissue is recognized not only as the main site of energy storage, but also as a complex, essential, and highly active metabolic and endocrine organ. Besides adipocytes, adipose tissue contains connective tissue matrix, nerve tissue, stromovascular cells, and immune cells.<sup>1</sup> Although adipocytes express and secrete several endocrine hormones such as leptin and adiponectin, many secreted proteins are derived from the nonadipocyte fraction of adipose tissue, making adipose tissue a true endocrine organ.<sup>2</sup>

Human adipose tissue is divided in two depots with distinctive functions, the subcutaneous and the omental fat depot. Many epidemiologic studies have shown that the size of the

omentum, more than the subcutaneous, adipose tissue is closely associated with a higher risk of obesity-related co-morbidities, such as insulin resistance, type 2 diabetes, dyslipidemia and cardiovascular disease. A recent study, including 3001 subjects from the Framingham Heart Study, investigated omental and subcutaneous adipose tissue volumes in relation with several metabolic risk factors, concluding that omental adipose tissue is strongly associated with metabolic risk factors, and that it could be a unique, pathogenic fat depot.<sup>3</sup> However, the underlying mechanism for this association is not yet clear. Presumably, distinctive biological properties of omental fat contribute to the increased burden of metabolic disease associated with central obesity. The omental, but not the subcutaneous, adipose tissue has a direct access to the liver through the portal vein, and some data suggest that there is excess free fatty acid release from the omental adipose tissue in central obesity. These fatty acids might interfere with liver metabolism and contribute to the development of disturbances such as glucose intolerance, hyperinsulinemia, and hypertriglyceridemia.<sup>4</sup> Site differences in lipolysis have been repeatedly demonstrated and the mechanisms reside at the level of the major lipolysis-regulating hormones. The lipolytic action of catecholamines is decreased in subcutaneous but increased in omental adipose tissue, while the antilipolytic effect of insulin and prostaglandins is much less pronounced in omental than

\* To whom correspondence should be addressed. Belén Peral, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas & Universidad Autónoma de Madrid, Arturo Duperier 4, E-28029 Madrid, Spain. Tel: 34-915854478. Fax: 34-915854401. E-mail: bperal@iib.uam.es.

<sup>†</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas & Universidad Autónoma de Madrid.

<sup>‡</sup> Department of Diabetes, Endocrinology and Nutrition, and CIBEROBN Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Hospital Dr. Josep Trueta.

<sup>§</sup> Unidad de Proteómica, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC).

subcutaneous fat cells.<sup>4</sup> Moreover, the basal lipolytic rate is higher in subcutaneous than in omental adipocytes. Other studies have reported that the insulin stimulated glucose uptake per kilogram fat is higher in omental than in subcutaneous adipose tissue<sup>5</sup> and the metabolic activity in omental adipose tissue is higher than in the subcutaneous depot, both in obese and lean individuals.

Confirmation of these functional differences between omental and subcutaneous adipose tissue at the molecular level has been provided by a number of gene expression studies (i.e., microarrays and RT-PCR) on both fat depots.<sup>6–12</sup> Differentially expressed genes were mainly related to adipogenesis, insulin signaling, protein synthesis, carbohydrate and lipid metabolism and immune system. At the protein level, however, due to technical hurdles, the knowledge about human adipose tissue is very limited, and so far, the few proteomic studies reported have focused on cultured adipocytes<sup>13,14</sup> and murine adipose tissue.<sup>15,16</sup> To date, no proteomic studies investigating the difference between omental and subcutaneous human adipose tissue proteins have been reported, except for a few studies focusing on one or two proteins. To the best of our knowledge, we describe the first proteomic study comparing these two fat depots by combining two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) and mass spectrometry (MS). This approach has been successfully applied to study human adipose tissue in morbidly obese women with polycystic ovary syndrome.<sup>17</sup> We identified 43 proteins differentially expressed in the two fat depots. Moreover, our findings emphasize the higher metabolic activity of the omental compared to the subcutaneous fat with the identification of a number of proteins up-regulated in the omental adipose tissue involved in different metabolic pathways, such as carbohydrate and lipid metabolism, oxidation–reduction, lipid transport, protein synthesis, intracellular trafficking, cellular stress and inflammation.

## Materials and Methods

**Study Design.** Human omental and subcutaneous adipose tissue was obtained during surgery and extracted proteins were analyzed by a proteomic approach using 2D-DIGE. Samples were labeled using fluorophore dye-swapping to avoid labeling bias, combined in pairs and separated by 2-DE. Image analysis revealed differentially expressed proteins, which were subsequently identified by MALDI-TOF/TOF. Result validation was performed by Western blot and/or tissue immunolocalization analyses using an additional set of subjects.

**Biological Samples.** Paired samples of omental and subcutaneous adipose tissue were obtained from 26 Caucasian men and 9 Caucasian women who had been submitted for elective surgical procedures (cholecystectomy, surgery of abdominal hernia and gastric bypass surgery). Obese subjects had a body mass index (BMI) > 30 kg/m<sup>2</sup>. Subject age ranged from 25 to 65 years and BMI ranged from 20.03 to 58.91 kg/m<sup>2</sup>. Seven subjects had a BMI < 30 kg/m<sup>2</sup>, 7 were obese (30 kg/m<sup>2</sup> < BMI < 40 kg/m<sup>2</sup>), and 21 morbidly obese (BMI > 40 kg/m<sup>2</sup>). During surgery, biopsies of adipose tissues were obtained, washed in chilled NaCl 0.9% solution, partitioned into pieces, frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C until protein extraction. The surgeon aimed to obtain the samples from similar anatomical locations in all the subjects. The study was conducted according to the recommendations of the Declaration of Helsinki and was approved by the ethics committees of Hospital Dr. Josep Trueta (Girona, Spain). Signed informed consent was obtained from all subjects.

**Sample Preparation.** Proteins were extracted from subcutaneous and omental adipose tissue (200 mg) by using a Polytron PT-1200C homogenizer (Kinematica AG, Lucerne, Switzerland) directly in Disruption Buffer (8.4 M urea, 2.4 M thiourea, 5% CHAPS, and 50 mM DTT). The suspension was shaken for 60 min at room temperature and centrifuged at 70 000 rpm for 90 min, according to the procedure developed by our group.<sup>18</sup> Interfering components were removed using the 2D Clean Up Kit (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, U.K.), and proteins were resuspended in Lysis Buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, and 30 mM Tris-HCl, pH 8.5). The protein concentration was determined using the RC/DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). For protein detection in Western blot, fat tissue was homogenized in radioimmuno precipitation assay (RIPA) buffer (0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 1% Nonidet P-40, 150 mM NaCl, and 50 mM Tris-HCl, pH 8.0), supplemented with protease inhibitors (1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 g/mL aprotinin and 2 g/mL leupeptin). Cellular debris and lipids were eliminated by centrifugation of the solubilized samples at 13 000 rpm for 60 min, recovering the soluble fraction below the fat supernatant and avoiding the unhomogenized material at the bottom of the centrifuge tube. Protein concentration was determined by BCA Protein Assay (Pierce, Rockford, IL).

**Conventional Two-Dimensional Gel Electrophoresis (2-DE).** Protein extracts (100 µg) were diluted in Lysis Buffer containing 50 mM DTT and 0.8% (v/v) Pharmalytes 3–10, and were applied by in-gel rehydration to IPG strips pH 4–7. Proteins were separated in the second dimension using 12.5% Tris-glycine/SDS gels in a Protean II XL system (Bio-Rad Laboratories). 2-DE gels were silver stained using a protocol compatible with mass spectrometry.<sup>19</sup>

**2D-DIGE Separation.** Proteins were labeled according to the manufacturer's instruction (GE Healthcare). Briefly, 50 µg of omental and subcutaneous adipose tissue protein extracts were minimally labeled with 400 pmol of the *N*-hydroxysuccinimide esters of Cy3 or Cy5 fluorescent cyanine dyes on ice in the dark for 30 min. All experiments comprised an internal standard containing equal amounts of each cell lysate, which was labeled with Cy2 dye. The labeling reaction was quenched with 1 µL of 10 mM lysine on ice in the dark for 10 min. The internal standard and the omental and subcutaneous adipose tissue protein extracts were combined and run in a single gel (150 µg of total proteins). Proteins extracts were diluted in Rehydration Buffer (7 M urea, 2 M thiourea, and 2% CHAPS) containing 0.8% (v/v) IPG buffer 3–11 NL, reduced with 50 mM DTT, and applied by cup-loading to 24 cm IPG strips pH 3–11 NL, which were previously rehydrated with Rehydration Buffer containing 100 mM hydroxyethyl disulfide (DeStreak, GE Healthcare) and 0.8% (v/v) IPG buffer 3–11 NL as described.<sup>18</sup> The first dimension was run at 0.05 mA/IPG strip in the IPGphor IEF II System (GE Healthcare) following a stepwise voltage increase: 300 V for 3 h, linear gradient to 1000 V in 4 h, linear gradient to 8000 V in 2 h and 8000 V until ca. 40 000 Vh. After the first dimension, strips were equilibrated in SDS Equilibration Buffer (75 mM Tris, pH 8.8, 6 M urea, 30% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS, and trace amounts of bromophenol blue) containing 1% (w/v) DTT for 15 min, and thereafter in SDS Equilibration Buffer containing 4% (w/v) iodoacetamide for 15 additional min. After equilibration, proteins were separated on 12% Tris-glycine gels using an Ettan Dalt Six device (GE Healthcare) at 25 °C until the tracking dye had migrated off the bottom of the gel.

**Image Acquisition and Analysis.** After SDS-PAGE, gels were scanned with a Typhoon 9400 scanner (GE Healthcare) at 100  $\mu\text{m}$  resolution using appropriated individual excitation and emission wavelengths, filters and photomultiplier (PMT) sensitivity for each Cy2, Cy3 and Cy5 dyes (PMT values: 510, 510 and 475, respectively). Relative protein quantification across omental and subcutaneous adipose samples was performed according to DeCyder software v6.5.15.2 and multivariate statistical module EDA (Extended Data Analysis) v1.0.15.2 (GE Healthcare) as follows. First, Differential In-gel Analysis (DIA) module co-detected the 3 images of a gel (internal standard and two samples), measured spot abundance in each image and expressed these values as a ratio. Background subtraction, quantification and normalization were automatically applied with low experimental variation (DeCyder Differential Analysis Software User Manual, version 6.5; GE Healthcare, 2005). The Biological Variation Analysis (BVA) module utilized those images individually processed with the DIA module to match protein spots across gels, using the internal standard for gel-to-gel matching. Statistical analysis was then carried out to determine protein expression changes. *P*-values lower than 0.05 as calculated from Student's *t* test were considered significant. Multiple testing was assessed using the False Discovery Rate (FDR) method to obtain the corresponding *q*-values. Multivariate analysis was performed by PCA (Principal Component Analysis) using the algorithm included in the EDA module of the DeCyder software v6.5.15.2 based on the spots matched across all gels.

**In-Gel Trypsin Digestion.** Protein spots showing significantly altered expression levels between the 2 groups of samples by DeCyder Differential Analysis Software were selected for gel excision. Protein spots from silver-stained gels were visually matched against DIGE images, manually excised from gels, and transferred to pierced V-bottom 96-well polypropylene microplates (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) loaded with ultrapure water. Samples were digested automatically using a Proteineer DP protein digestion station (Bruker Daltonik) according to the protocol of Schevchenko et al.<sup>20</sup> with minor variations: gel plugs were submitted to reduction with 10 mM DTT (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) in 50 mM ammonium bicarbonate (99.5% purity; Sigma Chemical, St. Louis, MO) and alkylation with 55 mM iodoacetamide (Sigma Chemical) in 50 mM ammonium bicarbonate. Gel pieces were then rinsed with 50 mM ammonium bicarbonate and acetonitrile (gradient grade; Merck, Darmstadt, Germany) and dried under a nitrogen stream. Modified porcine trypsin (sequencing grade; Promega, Madison, WI) at a final concentration of 8 ng/ $\mu\text{L}$  in 50 mM ammonium bicarbonate was added to the dry gel pieces, and digestion proceeded at 37 °C for 8 h. Finally, 0.5% trifluoroacetic acid (99.5% purity; Sigma Chemical) was added for peptide extraction, and the resulting digestion solutions were transferred by centrifugation to V-bottom 96-well polypropylene microplates (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany).

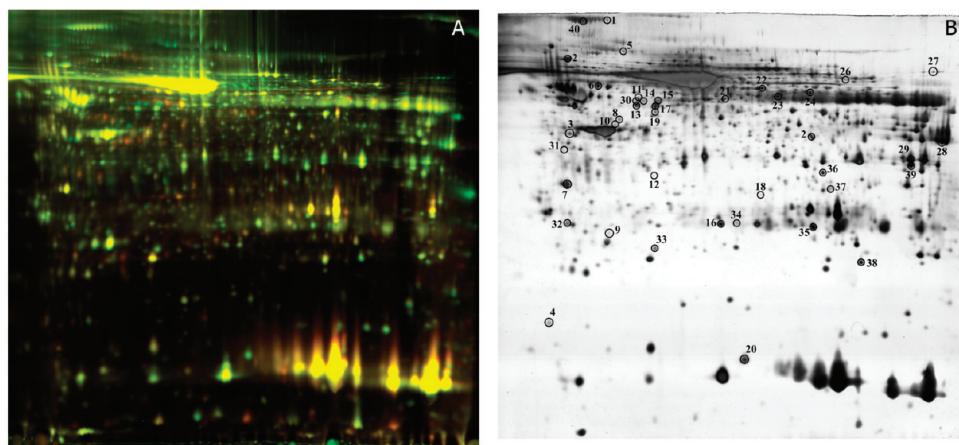
**Mass Spectrometry.** MALDI samples were prepared by mixing equal volumes of the above-mentioned digestion solution and a matrix solution composed of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (Bruker Daltonik) in 50% aqueous acetonitrile and 0.25% trifluoroacetic acid. This mixture was deposited onto a 600  $\mu\text{m}$  AnchorChip prestructured MALDI probe (Bruker Daltonik)<sup>21</sup> and allowed to dry at room temperature. Samples were automatically analyzed in an Ultraflex MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (Bruker Daltonik)<sup>22</sup> with an automated analysis loop controlled by the flexControl 2.2 software (Bruker

Daltonik). In a first step, MALDI-MS spectra were acquired by averaging 300 individual spectra in the positive ion reflector mode at 50 Hz laser frequency in a mass range from 800 to 4000 Da. Internal calibration of MALDI-MS mass spectra was performed using two trypsin autolysis ions with *m/z* = 842.510 and *m/z* = 2211.105. In a second step, precursor ions showing in the MALDI-MS mass spectrum were subjected to fragment ion analysis in the tandem (MS/MS) mode to average 1000 spectra. Automated analysis of mass data was performed using the flexAnalysis 2.2 software (Bruker Daltonik). No smoothing or any further spectral processing was applied. MALDI-MS and MS/MS spectra were manually inspected in detail and reacquired, recalibrated, and/or relabeled using the aforementioned programs and homemade software when necessary.

**Database Searching.** MALDI-MS and MS/MS data were combined through the BioTools 3.0 program (Bruker Daltonik) to search a nonredundant protein database (NCBIInr 20080125,  $\sim 5.9 \times 10^6$  entries, National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD), using the Mascot software (Matrix Science, London, U.K.; <http://www.matrixscience.com>).<sup>23</sup> Other relevant search parameters were set as follows: enzyme, trypsin; fixed modifications, carbamidomethyl (C); allow up to 1 missed cleavage; peptide tolerance  $\pm 20$  ppm; MS/MS tolerance  $\pm 0.5$  Da. Protein scores greater than 81 were considered significant (*p* < 0.05).

**Immunoblotting.** RIPA protein extracts (20  $\mu\text{g}$ ) were resolved on 10–14% SDS-PAGE and transferred onto Hybond ECL nitrocellulose membranes by conventional procedures. Membranes were stained with 0.15% Ponceau red (Sigma) to ensure equal loading after transfer and then blocked with 5% (w/v) BSA or dried nonfat milk in TBS buffer with 0.1% Tween 20. Immunoblotting was performed with 1:2000 mouse anti-human HSP90 monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology), 1:200 goat anti-human HSP27 polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology), 1:1000 mouse anti-human HSP70 monoclonal antibody (Stressgen BioReagents), 1:200 goat anti-human FABP5 polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology), 1:4000 mouse anti-human GAPDH monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology) and 1:2000 mouse anti-human CK-8/18 monoclonal antibody (Novocastra Laboratories). Following incubation with the primary antibody, the membranes were washed in TBS with 0.1% Tween 20 and incubated with the appropriate IgG-HRP-conjugated secondary antibody. Immunoreactive bands were visualized with an enhanced-chemiluminescence (ECL-plus) reagent kit (GE Healthcare). Optical densities of the immunoreactive bands were measured using Image J analysis software. Statistical comparisons of the densitometry data were made with the paired *t* test and results were expressed as means  $\pm$  standard deviation (SD) using SPSS 16.0. Statistical significance was set at the *P* < 0.05 level for all analyses.

**Immunohistochemistry.** Five-micrometer sections of formalin-fixed, paraffin-embedded adipose tissue were deparaffinized and rehydrated prior to antigen unmasking by boiling in 1 mM EDTA, pH 8. Sections were blocked in normal serum and incubated overnight with the following antibodies: mouse anti-human CK-18 (Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg, Germany) at 1:25 dilution, goat anti-human FABP5 at 1:200 dilution, and mouse anti-human CD68 (Santa Cruz Biotechnology) at 1:25 dilution. Secondary antibody staining was performed using the VECTASTAIN ABC kit (Vector laboratories, Inc., Burlingame, CA) and detected with diaminobenzidine (DAB, Vector Laboratories, Inc.). Sections were counterstained with hematoxylin prior to dehydration and coverslip placement.



**Figure 1.** 2D-DIGE of adipose tissue proteins. Protein extracts from omental and subcutaneous adipose tissue and a pooled internal standard were labeled with CyDyes Cy3, Cy5 and Cy2, respectively, and were mixed and separated on a 2-DE gel using 24 cm pH 3–11 NL strips in the first dimension and 12% SDS-PAGE gels in the second dimension. Gels were scanned to obtain single images of omental proteins (Cy3, green), subcutaneous proteins (Cy5, red) or the internal standard (Cy2, blue) (not shown). An overlay of the two dyes (Cy3, Cy5) is shown (A). The same gel, after fluorescence imaging, was silver-stained and scanned. Numbers correspond to differentially expressed protein spots as indicated in Table 1 (B).

As a negative control, the entire immunohistochemical procedure was performed on adjacent sections in the absence of primary antibody.

**Immunofluorescence.** Five-micrometer sections of frozen adipose tissue were fixed with paraformaldehyde 4% and Phosphate Buffered Saline (PBS). Immunofluorescence staining was performed overnight at 4 °C with mouse anti-human CK-18 antibody (Progen Biotechnik GmbH) at 1:25 dilution, washed, and visualized using Alexa Fluor 546 goat anti-mouse antibody (1:500; Molecular Probes, Inc., OR). As a negative control, the entire immunofluorescence procedure was performed in the absence of primary antibody. The slides were counterstained with DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) to reveal nuclei.

## Results

**2-DE Analysis of Omental and Subcutaneous Adipose Tissue.** Comparative gene expression analysis using omental and subcutaneous adipose tissue has been previously assessed in humans, showing less intraindividual than interindividual variation.<sup>11</sup> To select those tissue samples showing the lowest interindividual variability for later analysis by 2D-DIGE, we carried out a preliminary study by conventional 2-DE (4–7 pH strips and silver staining) using subcutaneous and omental adipose tissue protein extracts from a group of 15 obese and morbidly obese male subjects. Comparison of paired silver-stained gels highlighted the presence of six spots in the omental fat proteome that were absent in the subcutaneous adipose tissue proteome (Figure S1, Supporting Information). This pattern was reproducible in all pairs of tissues analyzed, independently of BMI, and even in adipose tissue 2-DE gels from 20 additional lean and obese women (data not shown). The six spots were excised from two different silver-stained 2-DE gels representing omental fat from two different individuals, digested in-gel with trypsin, and analyzed by MALDI-TOF/TOF for protein identification. The six spots were identified as cytokeratin 7 (CK-7), cytokeratin 8 (CK-8), cytokeratin 18 (CK-18, two spots), and cytokeratin 19 (CK-19, two spots) (Figure 1 and Table 1).

S1 and Table S2, Supporting Information). These results were confirmed by later 2D-DIGE analysis.

**DIGE Analysis of Omental and Subcutaneous Adipose Tissue and MALDI-TOF/TOF Identification.** After detailed examination of the 15 omental and subcutaneous proteomes, we selected a group of four highly homogeneous samples in terms of protein spot pattern and BMI (30–39 range) for further analysis by 2D-DIGE. Some reproducibility difficulties limit the accuracy of 2D gels for relative quantification of proteins.<sup>24</sup> To improve the analytical capacity and the statistical reliability of 2-DE gels, the DIGE technology is currently applied with high sensitivity, reproducibility and wide dynamic range.<sup>25,26</sup>

To avoid labeling bias arising from the fluorescence properties of gels at different wavelengths, protein extracts were labeled using dye-swapping with either Cy3 or Cy5 fluorescent dye. Then, each Cy3/Cy5-labeled sample pair was mixed with a Cy2-labeled internal standard and loaded onto each gel. After 2-DE, the Cy2, Cy3 and Cy5 channels were individually imaged from each gel. Automated image analysis performed with DeCyder Software detected approximately 2500 spots per gel in the 3–11 NL pH range with a molecular mass of 10–150 kDa, of which 1195 spots were matched throughout all gels. After visual inspection, only a few unmatched spots required manual matching. Multivariate PCA showed that the “omental group” was efficiently discriminated from the “subcutaneous group” (Figure 2). DeCyder statistical analyses revealed changes in the abundance of 70 protein spots at  $p < 0.05$  considering only those spots present in all gels. FDR analysis demonstrated that the majority of these spots showed the lowest calculated  $q$ -values (Table S1, Supporting Information). These spots were excised from silver-stained gels, digested with trypsin, and analyzed by MALDI-TOF/TOF followed by database search. Forty-three proteins could be identified, 34 of which were increased and 9 decreased in the omental adipose tissue (Figure 1 and Table 1).

Most of these proteins could be grouped into several molecular and biological functions, according to Gene Ontology (GO; [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) and Ingenuity Pathways Analysis (IPA; [www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)), such as protein folding and stress response (heat shock proteins, HSP70, HSP90 isoforms A and

**Table 1.** Proteins Identified by MALDI-TOF/TOF Showing Significant Changes between Human Omental and Subcutaneous Adipose Tissue

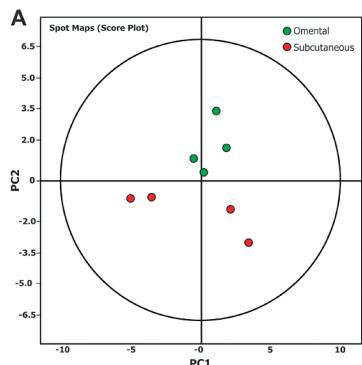
spot number <sup>a</sup>	DIGE p-value <sup>b</sup>	DIGE oment/subc <sup>c</sup>	accession code <sup>d</sup>	protein name	Mascot						
					total score <sup>e</sup>	expect <sup>f</sup>	ions score <sup>g</sup>	MW kDa <sup>h</sup>	pI theor. <sup>i</sup>	matched peptides <sup>j</sup>	
1	4.70 × 10 <sup>-2</sup>	1.4	Q1L857_HUMAN	Ceruloplasmin	195	6.30 × 10 <sup>-15</sup>	83	116.2	5.4	8	10
2	3.50 × 10 <sup>-2</sup>	1.5	HS90A_HUMAN	Heat shock protein HSP 90-alfa	306	5.00 × 10 <sup>-26</sup>	96	85.0	4.9	26	37
			HS90B_HUMAN	Heat shock protein HSP 90-beta	139	2.50 × 10 <sup>-9</sup>		83.6	5.0	11	19
3	1.60 × 10 <sup>-3</sup>	5.6	K1C19_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 19	385	6.90 × 10 <sup>-34</sup>	85	44.1	5.0	18	39
4	2.80 × 10 <sup>-3</sup>	-1.8	CYB5_HUMAN	Cytochrome b-5 isoform 2	171	1.60 × 10 <sup>-12</sup>	69	11.3	5.0	4	58
5	2.20 × 10 <sup>-2</sup>	-2.0	FIBG_HUMAN	Fibrinogen gamma	201	1.60 × 10 <sup>-15</sup>		46.8	5.5	11	38
6	4.30 × 10 <sup>-2</sup>	1.4	ANT3_HUMAN	Antithrombin III	408	3.20 × 10 <sup>-36</sup>	197	49.4	6.0	14	41
7	2.30 × 10 <sup>-2</sup>	-1.3	ANXA5_HUMAN	Annexin A5	495	6.30 × 10 <sup>-45</sup>	221	36.0	4.9	19	55
8	3.50 × 10 <sup>-2</sup>	1.6	IF4A1_HUMAN	Eukaryotic translation initiation factor 4A isoform 1	417	4.30 × 10 <sup>-37</sup>	260	46.4	5.3	6	19
			IF4A2_HUMAN	Eukaryotic initiation factor 4A-II	153	1.10 × 10 <sup>-10</sup>	106	46.6	5.3	8	19
9	4.10 × 10 <sup>-2</sup>	1.3	APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	105	6.30 × 10 <sup>-6</sup>		28.1	5.3	8	33
10	8.30 × 10 <sup>-2</sup>	2.5	K1C18_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 18	176	5.00 × 10 <sup>-13</sup>		47.3	5.3	13	34
11	1.90 × 10 <sup>-3</sup>	7.0	K2C7_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 7	160	2.00 × 10 <sup>-11</sup>		51.4	5.4	10	26
12	2.60 × 10 <sup>-4</sup>	3.1	APOE_HUMAN	Apolipoprotein E	152	3.70 × 10 <sup>-9</sup>	90	36.2	6.0	4	11
13	1.50 × 10 <sup>-2</sup>	1.7	FIBG_HUMAN	Fibrinogen gamma	328	3.20 × 10 <sup>-28</sup>	118	48.0	5.5	12	40
14	3.50 × 10 <sup>-2</sup>	4.7	K2C8_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 8	206	5.00 × 10 <sup>-16</sup>		53.5	5.5	15	37
15	2.80 × 10 <sup>-3</sup>	5.9	EST1_HUMAN	Carboxylesterase 1	171	1.60 × 10 <sup>-12</sup>	97	56.4	5.9	5	8
16	6.10 × 10 <sup>-3</sup>	1.5	HSPB1_HUMAN	Heat shock protein 27	285	6.30 × 10 <sup>-24</sup>	171	22.4	7.8	6	40
17	1.40 × 10 <sup>-2</sup>	1.5	FIBG_HUMAN	Fibrinogen gamma	256	5.00 × 10 <sup>-21</sup>	125	46.8	5.5	9	24
18	8.80 × 10 <sup>-3</sup>	-1.4	PSA1_HUMAN	Proteasome subunit, alpha 1, isoform CRA_b	152	1.30 × 10 <sup>-10</sup>	50	34.2	6.6	6	19
19	7.30 × 10 <sup>-3</sup>	1.3	FIBG_HUMAN	Fibrinogen gamma	186	5.00 × 10 <sup>-14</sup>		46.8	5.5	11	38
20	6.20 × 10 <sup>-3</sup>	1.6	FABP5_HUMAN	Fatty acid binding protein 5, epidermal	187	4.00 × 10 <sup>-14</sup>	94	15.5	6.6	5	41
21	4.20 × 10 <sup>-2</sup>	1.5	SBP1_HUMAN	Selenium binding protein 1	428	3.20 × 10 <sup>-38</sup>	178	52.9	5.9	14	31
22	4.80 × 10 <sup>-2</sup>	-1.5	EST1_HUMAN	Carboxylesterase 1	197	4.00 × 10 <sup>-15</sup>	83	56.4	5.9	7	13
23	2.60 × 10 <sup>-3</sup>	3.0	AL1A1_HUMAN	Aldehyde dehydrogenase 1A1	382	1.30 × 10 <sup>-33</sup>	181	55.5	6.3	14	31
24	4.20 × 10 <sup>-2</sup>	1.4	DLDH_HUMAN	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	243	1.00 × 10 <sup>-19</sup>	102	50.7	6.5	9	26
25	5.10 × 10 <sup>-3</sup>	-1.6	ALDOC_HUMAN	Fructose-bisphosphate aldolase C	291	2.50 × 10 <sup>-9</sup>		39.8	6.4	11	35
			PCBP1_HUMAN	Poly(rC) binding protein 1				38.0	6.7	10	44
26	3.80 × 10 <sup>-3</sup>	1.5	TKT_HUMAN	Transketolase	218	3.20 × 10 <sup>-17</sup>	108	68.5	7.6	7	18
27	4.90 × 10 <sup>-2</sup>	1.6	CO4A_HUMAN	Complement C4-A	152	1.30 × 10 <sup>-10</sup>		189.1	6.7	13	7
28	2.50 × 10 <sup>-2</sup>	1.6	ADH1B_HUMAN	Alcohol Dehydrogenase 1B	133	1.00 × 10 <sup>-8</sup>		40.5	8.5	7	26
29	4.40 × 10 <sup>-2</sup>	1.4	G3P_HUMAN	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	235	6.30 × 10 <sup>-19</sup>	100	36.2	8.3	7	29
30	1.90 × 10 <sup>-3</sup>	7.0	K2C8_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 8	98	2.90 × 10 <sup>-5</sup>		53.5	5.5	9	22
31	7.10 × 10 <sup>-3</sup>	1.3	RSSA_HUMAN	40S ribosomal protein SA (Laminin receptor 1)	338	1.00 × 10 <sup>-27</sup>	150	19.9	8.4	10	61
32	2.80 × 10 <sup>-2</sup>	1.4	CPNS1_HUMAN	Calpain small subunit 1	197	1.30 × 10 <sup>-13</sup>	101	21.4	4.9	5	26
33	3.20 × 10 <sup>-2</sup>	1.3	GSTP1_HUMAN	Glutathione S-transferase P	330	6.50 × 10 <sup>-27</sup>	231	23.4	5.1	5	36
34	3.00 × 10 <sup>-2</sup>	1.2	Q6PIH6_HUMAN	IGKV1-5 protein	224	2.60 × 10 <sup>-16</sup>	79	26.5	6.3	8	40
35	3.50 × 10 <sup>-2</sup>	1.6	HSP71_HUMAN	Heat shock 70 kDa protein 1	158	1.00 × 10 <sup>-9</sup>	81	42.2	6.6	4	14
36	4.70 × 10 <sup>-2</sup>	1.3	TPIS_HUMAN	Triosephosphate isomerase	353	3.30 × 10 <sup>-29</sup>	115	26.9	6.5	12	48
37	3.10 × 10 <sup>-2</sup>	-1.8	MGLL_HUMAN	Monoglyceride lipase isoform 2	240	6.50 × 10 <sup>-18</sup>	128	33.5	6.5	6	21
38	1.70 × 10 <sup>-2</sup>	-2.0	THTR_HUMAN	Thiosulfate sulfurtransferase	339	8.20 × 10 <sup>-28</sup>	137	33.6	6.8	11	40
39	3.90 × 10 <sup>-2</sup>	1.2	PEBP1_HUMAN	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	452	4.10 × 10 <sup>-39</sup>	204	21.2	7.0	13	60
40	4.10 × 10 <sup>-2</sup>	1.5	ANXA2_HUMAN	Annexin A2 isoform 2	315	2.10 × 10 <sup>-25</sup>	73	38.8	7.6	17	48

<sup>a</sup> Spot numbering as shown in 2-DE silver gel in Figure 1. <sup>b</sup> P-value of the Student *t* test. <sup>c</sup> Average volumen ratio (Omental/Subcutaneous) as calculated by DeCyder analysis. <sup>d</sup> Protein accession code from Swiss-Prot database. <sup>e</sup> Mascot score. <sup>f</sup> Expected value. <sup>g</sup> Mascot Ions score. <sup>h</sup> Theoretical molecular weight (kDa). <sup>i</sup> Theoretical pI. <sup>j</sup> Number of matched peptides. <sup>k</sup> Protein sequence coverage for the most probable candidate as provided by Mascot. Multivariate statistical FDR analysis (*q*-values) together with protein identification details (MS and MS/MS spectra) are listed in Supporting Information Table S1.

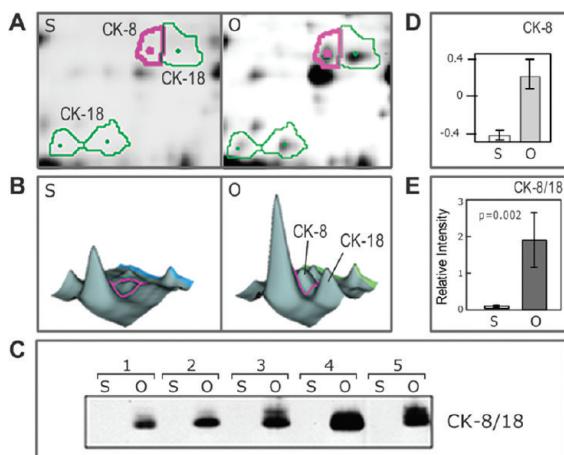
B, and HSP27), lipid metabolism (fatty acid binding protein 5, FABP5, monoglyceride lipase, MGLL, aldehyde dehydrogenase 1A1, AL1A1, alcohol dehydrogenase, ADH1B, APOA, APOE), carbohydrate metabolism (carboxylesterase, EST1, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH, triosephosphate isomerase, TPIS, aldolase C, ALDOC, AL1A1, glutathione S-transferase P, GSTP1, transketolase, TKT), inflammatory response (ceruloplasmin, CP, fibrinogen, FIBG, complement C4A), protein synthesis (eukaryotic initiation factor 1 and 2, eIF4A1, eIF4A2, and 40S ribosomal protein SA, RSSA), and

oxidation-reduction (CP, dihydrolipoyl dehydrogenase (DHL) from pyruvate dehydrogenase complex, ADH1B, AL1A1 and thiosulfate sulfurtransferase, THTR).

**Western Blot and Immunostaining Analyses.** Western blot and immunostaining analyses were performed for a group of biologically relevant proteins using an additional set of subjects. For immunoblotting analyses, we extracted proteins in RIPA buffer from omental and subcutaneous fat biopsies from 21 subjects, including 12 men and 9 women with BMI ranging from 20.03 to 51.9.



**Figure 2.** Unsupervised multivariate statistics from DIGE analysis. Multivariate analysis of DeCyder EDA module was carried out with 1195 spots. Principal Component Analysis (PCA) properly clusters subjects by condition (omental fat, green circles; subcutaneous fat, red). The external circle represents the 95% confidence.



**Figure 3.** CK-8 and CK-18 expression in human omental adipose tissue. Representative images of DIGE gels and 3D-view of selected spots showing cytokeratin-8 (CK-8) and cytokeratin-18 (CK-18) as differentially expressed by DeCyder BVA analysis (A and B). CK-8 and CK-18 were analyzed by Western Blot in omental (O) and subcutaneous (S) adipose tissue, with an antibody raised against CK-8 and CK-18. The results shown are representative of the immunoblotting analysis (C). Ratios for DIGE were obtained from DeCyder analysis (D); values for relative intensity obtained after densitometry of the bands are means  $\pm$  SD (E).

Western blot analyses using an antibody against two cytokeratins, CK-8 / 18 (Figure 3C,E), corroborated that these proteins were expressed exclusively in omental fat samples confirming 2-DE findings (Figure 3). Immunohistochemical analyses were also performed using an antibody against CK-18 in paraffin-embedded sections of omental and subcutaneous adipose tissue. Results revealed for the first time that cytokeratin CK-18 was localized specifically in the omental fat. Figure 4A shows a bright staining pattern on mesothelial cells surrounding adipocytes. At a higher magnification ( $\times 400$ ), it was easily confirmed that the cells were mesothelial cells (Figure S2, Supporting Information), as previously described in the literature.<sup>27</sup> In addition, immunofluorescence analyses were carried out in omental fat cryosections, also confirming the cellular location of CK-18 in adipose tissue mesothelium (Figure 4B). The negative control, with only secondary antibodies, did not show any staining with light or fluorescence microscopy (Figure 4A,B).

In addition, the heat shock proteins HSP90, HSP70 and HSP27 were subjected to immunoblotting analysis using specific antibodies. In each tissue tested, HSP90, HSP70 and HSP27 protein levels were significantly more abundant in the omental than in the subcutaneous fat depot, with independence of BMI or gender ( $p < 0.05$ ), confirming 2D-DIGE trend and ratios (Figure 5). Likewise, GAPDH protein levels were more abundant in the omental than in the subcutaneous adipose tissue when performing Western immunoblot analysis (Figure 5). In this study, we describe for the first time, to our knowledge, that GAPDH expression differs in the two fat depots, which is relevant because GAPDH is used to normalize mRNA and protein loading. In fact, GAPDH mRNA expression has been previously shown to vary according to obese status.<sup>28</sup>

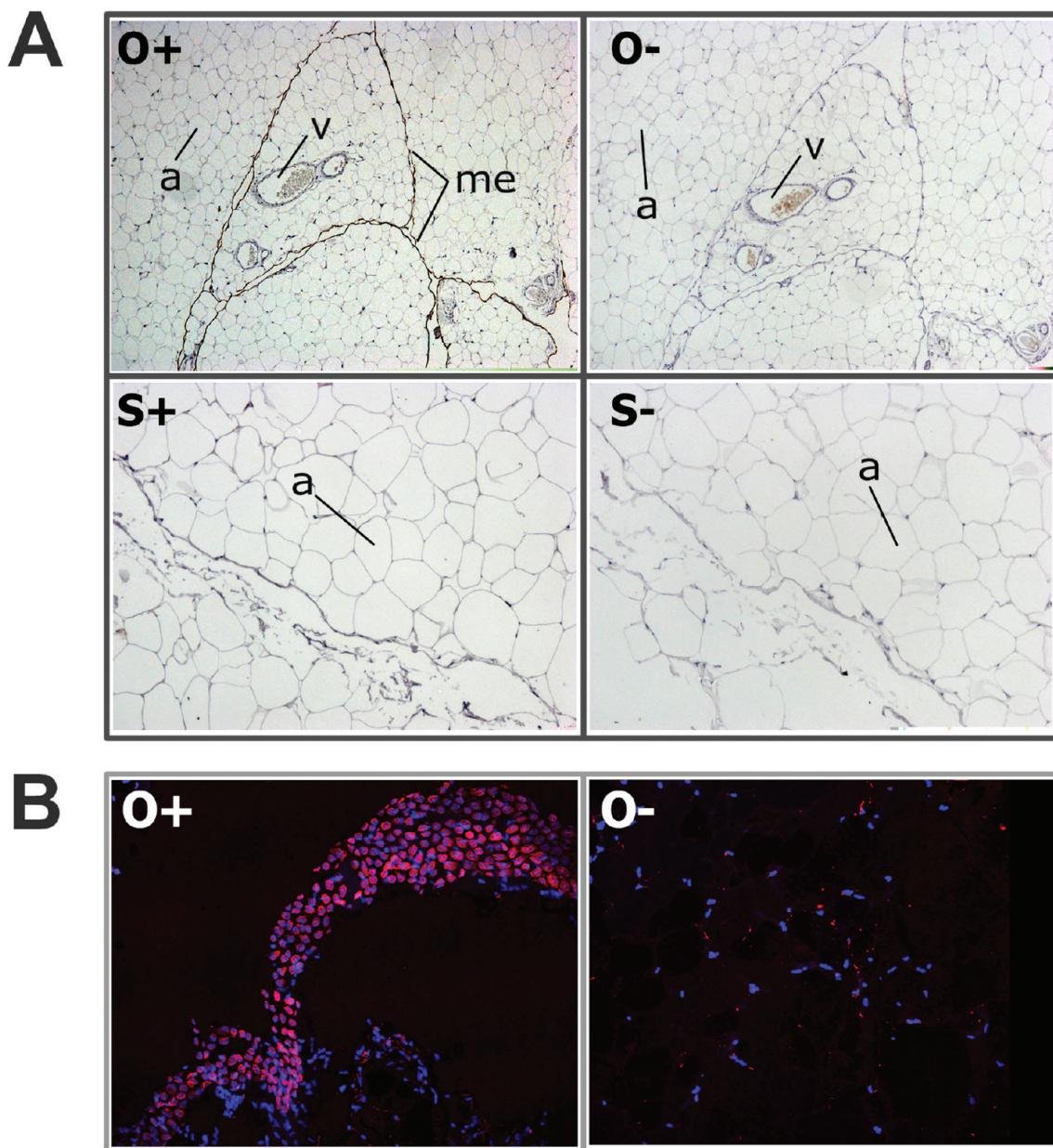
The keratinocyte fatty acid binding protein, FABP5, plays an important role in the adipose tissue not only for transporting fatty acid resulting from adipocyte lipolysis, but also for transporting retinoic acid into the nucleus favoring survival pathways.<sup>29</sup> With the use of a specific antibody, anti-human FABP5, immunoblotting analyses revealed an overexpression of FABP5 protein in the omental adipose tissue compared to the subcutaneous fat, thus, confirming 2D-DIGE results (Figure 6A,B). Immunohistochemical analyses were also performed to determine the cellular distribution of FABP5 in the human adipose tissue. FABP5 antibody stained the nucleus and the cytoplasm of adipocytes in the two fat depots, as well as small stromal cells between large adipocytes (Figure 6C). Some of the stromal cells were macrophages as shown by CD68 labeling (Figure 6C). However, no overexpression of FABP5 in omental fat as compared with subcutaneous adipose tissue could be detected in these preparations, probably due to the limited sensitivity of the technique under these experimental conditions.

## Discussion

Over the past few years, great efforts have been made to understand the mechanisms underlying obesity-related diseases. Emerging evidence highlights that reduced blood flow, local hypoxia, local inflammation and macrophage infiltration in the adipose tissue are interrelated and may lead to impaired adipokine secretion and excessive fat storage in nonadipose tissues, which together may result in metabolic derangement.<sup>30</sup> Obese subjects with a selective excess of omental adipose tissue have an increased risk of suffering these obesity-related disorders, and it has been speculated whether omental fat would be a causal factor, or a marker of “dysfunctional adipose tissue”<sup>31</sup>.

It is well-known that human omental and subcutaneous adipose tissues display differences in metabolic and biochemical properties as well as different cellular composition. Moreover, it has recently been shown that these two fat depots present dissimilar gene expression profiles.<sup>8–12,28</sup> Strikingly, however, no comparative proteomic studies based on omental and subcutaneous adipose tissue have been reported, despite that proteins are the actual functional units of the cell.

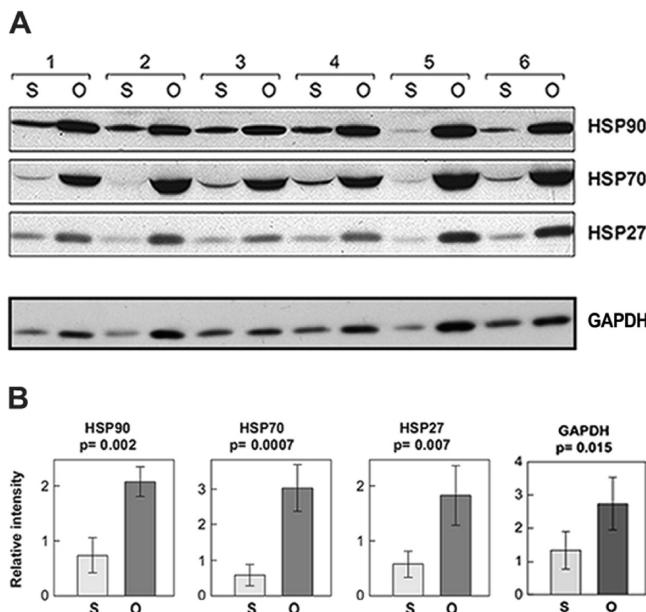
The quantitative comparison of proteins in two or more conditions is a widespread methodology, and the 2-DE/MS platform is a most adequate tool to assess differential protein expression despite its limitations.<sup>17</sup> Drawbacks inherent to 2-DE analysis are poor representation of low-abundance, extreme pI and molecular weight, and very hydrophobic proteins, and therefore, some differentially expressed proteins (e.g., regulatory proteins) involved in the pathogenesis of the disorder could be missed. To minimize interindividual spot pattern variability,



**Figure 4.** Expression of cytokeratin CK-18 in the omental adipose tissue mesothelial cells. Immunohistochemical detection of CK-18 in omental (O+) and subcutaneous (S+) adipose tissue demonstrating mesothelial cells in omental fat (brown), and immunostaining with the secondary antibody alone (O-, S-). Magnification  $\times 40$  in omental fat and  $\times 100$  in subcutaneous fat (A). Immunofluorescence detection of CK-18 in human omental adipose tissue cryosections showing staining in mesothelial cells in red, and the counterstaining of nuclei (DAPI) in blue. Magnification  $\times 100$  (B). Images are representative of adipose tissue preparations collected from five subjects. a, adipocyte; v, vessel; me, mesothelium.

we have analyzed a reduced number of subjects (homogeneous in terms of gender, BMI and obesity-related clinical phenotypes) by 2D-DIGE. This exploratory analysis cannot rule out the possibility that some of the expression differences could be false positives; nevertheless, a subset of regulated proteins has been further validated in a larger number of subjects using alternative approaches. In addition, since not only adipocytes, but also other nonadipocyte cell types are relevant for adipose tissue function, these analyses have also been performed on intact tissue, thereby preventing the introduction of artifactual changes resulting from processing and separating the various cell populations. Finally, it should be noted that the use of human adipose tissue makes this study particularly relevant.

Considering the central role that omental adipose tissue plays in abdominal obesity and related pathologies, we searched for proteins differentially expressed in omental and subcutaneous fat depots in obese individuals. In humans, the omental adipose tissue consists of a network of peritoneum sheets rich in mesothelial cells and filled with fat,<sup>27</sup> which extends from the greater curvature of the stomach to cover most abdominal organs. Unlike the subcutaneous adipose tissue, omental fat is characterized by the presence of mesothelial cells surrounding the fat lobules.<sup>27,32</sup> Our results have revealed the presence of epithelial cytokeratins CK-7, CK-8, CK-18 and CK-19<sup>33</sup> exclusively in the omental mesothelial cells. The function of these cells is unknown in the adipose tissue; however, it has



**Figure 5.** Immunoblot detection of heat shock proteins (HSPs) and GAPDH in human omental and subcutaneous adipose tissue. Representative Western blot analysis of HSP90, HSP70 and HSP27 expression (up) and GAPDH expression (down), in subcutaneous (S) and omental (O) fat samples. The results shown are representative of the immunoblotting analysis (A). Values for relative intensity for the four proteins in the omental and subcutaneous fat samples are means  $\pm$  SD (B).

been suggested that they could play a key role in the development of inflammatory processes by preferentially expressing IL-18.<sup>34</sup> Mesothelial cells could also contribute to the mechanical stress of enlarged, constrained omental adipocytes during obesity development.<sup>35</sup>

The omental fat is not only a lipid storage site, but also a reservoir of resident inflammatory cells and a major source of angiogenic and neurogenic factors. It is well-known that omental fat is closely linked to systemic inflammatory activity,<sup>36</sup> and this proteomic study has highlighted the overexpression of several proteins such as ceruloplasmin, fibrinogen, and the complement component C4-A involved in inflammatory processes, confirming previous transcript expression studies.<sup>7</sup>

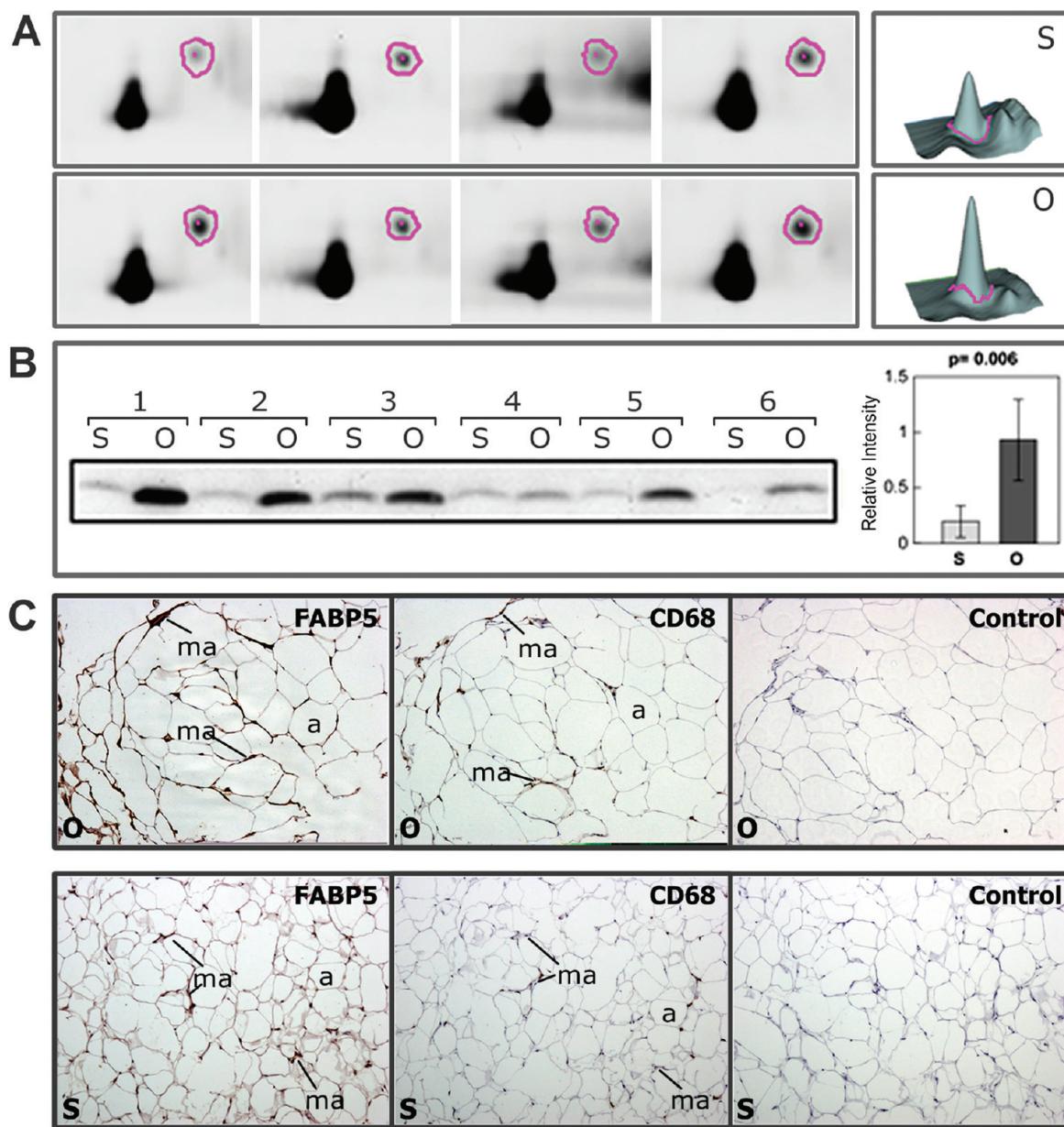
Omental fat is a highly active metabolic endocrine tissue, with increased aerobic metabolism and higher oxygen consumption.<sup>2</sup> The overexpression of dihydrolypoil dehydrogenase (DHL, from the pyruvate dehydrogenase complex) in the omental fat is in agreement with this higher mitochondrial oxidative metabolism. The increased relative abundance of several enzymes relating to the GO term *Metabolic Process*, such as CES, GAPDH, TPIS, TKT, ALDH1, GSTP1 and DHL, in the omental fat also supports omental fat as a highly active metabolic tissue.<sup>2</sup> This enhanced metabolic activity would demand newly synthesized proteins, encompassing chaperones, and should be accompanied by an elevated intracellular trafficking to deliver the newly synthesized proteins to the different organelles. The potential demand for novel synthesized proteins in the omental fat is supported by the overexpression of three proteins, 40S ribosomal protein SA (RSSA) and eukaryotic initiation factor 1 and 2 (eIF4A1, eIF4A2). The implication of genes involved in the protein synthesis pathway, including RSSA and EIF4A, has been earlier reported in transcript expression studies.<sup>8,12</sup> Moreover, an association of

EIF4A2 gene with type 2 diabetes has been recently reported in 148 French families.<sup>37</sup> Therefore, the overexpression of eIF4A in the omental fat from obese subjects might suggest altered protein synthesis pathways preceding insulin resistance and/or type 2 diabetes.

Results highlighted the overexpression in the omental fat of three heat shock proteins (HSPs), HSP90, HSP70 and HSP27. HSPs not only serve as chaperones, mainly controlling protein folding of newly translated polypeptides in the cytosol, as well as within organelles such as the endoplasmic reticulum (ER) and mitochondria,<sup>38</sup> but also play other key roles.<sup>39</sup> HSPs have been found to be involved in obesity, insulin resistance and diabetes,<sup>35,40,41</sup> while HSP70 has been found to be genetically associated with obesity and type 2 diabetes in case-control studies.<sup>42,43</sup> Moreover, proteomic analyses using primary cultures of human adipose-derived cells have reported an association of HSPs to adipogenesis,<sup>13,14</sup> while *in vitro* cellular studies have shown that the glucocorticoid receptor and the peroxisome proliferator-activated receptor form complexes with HSP70 and HSP90 in the cytosol prior to ligand activation.<sup>38,44,45</sup>

Environmental stresses as oxygen or glucose deprivation lead to the accumulation of incorrectly folded proteins in the ER lumen, resulting in ER stress and cellular activation of the Unfolding Protein Response (UPR) pathway.<sup>46</sup> It is worth mentioning that UPR has recently been suggested to initiate inflammation, and this process seems to be fundamental in the pathogenesis of inflammatory diseases as obesity.<sup>47</sup> HSPs have been involved in ER stress and UPR; in particular, HSP90 has been reported as an important component of the transcriptional arm of the UPR by binding the cytoplasmic domains of IRE1 $\alpha$  and PERK,<sup>48</sup> two of the transmembrane kinases that function as ER stress sensors. In accordance with the overexpression of HSPs found in the omental tissue, recent studies have reported increased ER stress in liver and adipose tissue of obese mice, which might interfere with the serine/threonine phosphorylation-mediated signal transduction pathway downstream of the insulin receptor.<sup>35,49–51</sup> Taken together, all these evidences reveal the crucial role played by HSPs in many processes associated with obesity and related co-morbidities. Data suggest that overexpression of these proteins in the omental compared to subcutaneous fat would not only account for the higher demand for chaperones, but also mediate in the accumulation of misfolded proteins in the RE omental cells. Further studies may contribute to explain if these processes could be the cause or consequence of the hypertrophied omental adipose tissue in incipient obesity.

Another mechanism contributing to obesity is impairment of lipolysis. The monoglyceride lipase (MGLL) has been found to be overexpressed in the subcutaneous compared to the omental fat, similarly as it was earlier reported in transcript expression studies.<sup>9</sup> MGLL functions together with hormone-sensitive lipase (HSL), the major lipase in adipose tissue, to hydrolyze intracellular triglyceride stores in adipocytes to fatty acids and glycerol. Despite that decreased HSL expression has been found in obese individuals and it could at least in part explain impaired lipolytic capacity,<sup>52</sup> studies relating MGLL with obesity have not been reported yet. MGLL also plays a major role in the enzymatic inactivation of the endocannabinoid (EC), 2-arachidonoylglycerol (2-AG).<sup>53</sup> It has been demonstrated that subcutaneous adipose tissue expresses MGLL and the rest of the biochemical machinery to metabolize ECs,<sup>54</sup> and in obesity, the EC system shows overactivity due to the upregulation of CB1 receptor and/or EC levels.<sup>55,56</sup> Our study



**Figure 6.** Overexpression of FABP5 in the omental vs subcutaneous adipose tissue. Zoomed images of DIGE gels in the FABP5 area (circled), and selected 3D-view of DeCyder BVA analysis (A). FABP5 expression analyzed by Western blot using an antibody against human FABP5, in subcutaneous (S) and omental (O) adipose tissue samples. Values for relative intensity obtained after densitometry of the bands are means  $\pm$  SD (B). Immunohistochemical detection of FABP5 and macrophage-specific antigen CD68 in omental (O) and subcutaneous (S) fat, showing FABP5 staining in adipocytes and macrophages (brown), and immunostaining with the secondary antibody alone, as a negative control (control). Magnification  $\times 100$ . Images are representative of adipose tissue sections collected from five subjects (C). a, adipocyte; ma, macrophage.

has shown expression of MGLL also in the omental fat; however, the reduced MGLL expression in this tissue in comparison with subcutaneous fat might suggest reduced hydrolysis of 2-AG, favoring fat accumulation by increasing EC signaling. Likewise, it has been found that impairment in the expression or activity of the second EC degrading enzyme, fatty acid amide hydrolase (FAAH), correlates with obesity in humans.<sup>57</sup>

Adipocytes are active sites of lipid metabolism involving storage, mobilization, and transport of lipids as well as utilization of lipid-mediated signaling pathways. These cells contain fatty acid binding proteins, mainly FABP4 and FABP5, to facilitate lipid usage in metabolic pathways.<sup>58</sup> DIGE and

immunoblotting analyses have shown significant overexpression of FABP5 in omental versus subcutaneous adipose tissue, as reported in adipose tissue from lean subjects.<sup>59</sup> FABP5 could play a role in metabolic syndrome, insulin resistance, type 2 diabetes, and atherosclerosis, as elucidated in numerous studies based on genetically modified mice.<sup>60–62</sup> In a high fat diet, mice overexpressing FABP5 showed a reduction in systemic insulin sensitivity,<sup>60</sup> while targeted null mutations in the FABP5 gene resulted in increased systemic insulin sensitivity.<sup>62</sup> However, in adipose tissue, not only adipocytes but also macrophages express FABP4 and FABP5, as reported in mice tissues and cell lines. These studies unveiled that the FABP4 to FABP5 ratio is approximately 99:1 in adipocytes,<sup>63</sup> and approximately 1:1 in

macrophages.<sup>64</sup> Our findings based on immunohistochemical analyses have shown for the first time the expression of FABP5 in adipocytes and macrophages in human omental and subcutaneous adipose tissue. Interestingly, it has been suggested that adipose tissue expression of FABPs in the two cell types is critical for the inflammatory basis of metabolic deterioration.<sup>65</sup> Results not only put forward that overexpression of FABP5 in the human omental fat could contribute to development of insulin resistance and to inflammatory response in obesity, but also suggest a more relevant biological function of FABP5 in macrophages.

It is noteworthy that FABP5 is also involved in survival pathways through the nuclear receptor PPAR $\delta/\beta$ , by binding retinoic acid (RA).<sup>29</sup> Interestingly, our proteomic study has revealed overexpression in the omental fat of alcohol dehydrogenase 1 (ADH1B) and retinal dehydrogenase 1A1 (AL1A1), two enzymes that control the transition from retinol (vitamin A) to RA. The metabolism of vitamin A and its biologically active derivatives, as retinaldehyde (Rald) and RA, is relevant in the physiology of the cell, since it is involved in the regulation of key processes such as cell proliferation, differentiation and apoptosis. The potential increase of RA levels caused by overexpression of ADH1B and AL1A1 in omental fat, together with the increase of FABP5, could suggest that survival pathways are favored in the omental adipose tissue. Moreover, mice lacking AL1A1 were preserved from developing diet-induced obesity and insulin resistance,<sup>66</sup> and therefore, increased levels of AL1A1 in the obese omental fat might produce the opposite effect, favoring fat accumulation.

In summary, this study has revealed differences in omental and subcutaneous adipose fat depots at the protein level affecting pathways related to metabolic processes such as glucose and lipid metabolism, lipid transport, protein synthesis, protein folding, response to stress and inflammation. Taken together, these results emphasize the role of omental fat in the development of diseases like insulin resistance and type 2 diabetes. In this regard, the identified proteins could be considered as potential markers for the future development of therapeutic strategies for these diseases.

## Conclusion

Results from our study comparing omental and subcutaneous adipose tissue will strengthen the understanding of molecular pathogenesis of obesity and related diseases. This work is the first proteomic study comparing the two human fat depots in obese people and represents one of the few proteomic analyses in human adipose tissue. Further characterization of differentially expressed proteins in these two fat depots from lean and obese subjects might contribute to clarify these fundamental issues.

**Acknowledgment.** This work was supported by Grant SAF-2006-02354 and Grant SAF-2008-02073 from the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain. We thank Cristina Gómez for her technical help, Dr. David Hardisson for assistance with immunohistochemical analysis, Dr. Fátima Sánchez-Cabo for statistical advice, and Dr. José Luis Martín-Ventura. We also acknowledge all the patients included in this study. The CNIC is supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation and the Pro CNIC Foundation. CIBER is an initiative from the Instituto de Salud Carlos III.

**Supporting Information Available:** Supplementary Figure S1, selected silver-stained gels of adipose tissue proteins;

Supplementary Figure S2, immunohistochemical detection of CK-18 in omental adipose tissue showing mesothelial cells; Supplementary Table S1, proteins identified by MALDI-TOF/TOF showing significant changes between omental and subcutaneous adipose tissue; Supplementary Table S2, proteins identified by MALDI-TOF/TOF specifically expressed in human omental adipose tissue. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## References

- Frayn, K. N.; Karpe, F.; Fielding, B. A.; Macdonald, I. A.; Coppack, S. W. Integrative physiology of human adipose tissue. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **2003**, *27* (8), 875–88.
- Kershaw, E. E.; Flieer, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2004**, *89* (6), 2548–56.
- Fox, C. S.; Massaro, J. M.; Hoffmann, U.; Pou, K. M.; Maurovich-Horvat, P.; Liu, C. Y.; Vasan, R. S.; Murabito, J. M.; Meigs, J. B.; Cupples, L. A.; D'Agostino, R. B., Sr.; O'Donnell, C. J. Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation* **2007**, *116* (1), 39–48.
- Arner, P. Insulin resistance in type 2 diabetes: role of fatty acids. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **2002**, *18* (Suppl. 2), S5–9.
- Virtanen, K. A.; Lonnroth, P.; Parkkola, R.; Peltoniemi, P.; Asola, M.; Viljanen, T.; Tolvanen, T.; Knuuti, J.; Ronnemaa, T.; Huupponen, R.; Nuutila, P. Glucose uptake and perfusion in subcutaneous and visceral adipose tissue during insulin stimulation in nonobese and obese humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2002**, *87* (8), 3902–10.
- Ramis, J. M.; Franssen-van Hal, N. L.; Kramer, E.; Llado, I.; Bouillaud, F.; Palou, A.; Keijer, J. Carboxypeptidase E and thrombospondin-1 are differently expressed in subcutaneous and visceral fat of obese subjects. *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, *59* (11), 1960–71.
- Gabrielsson, B. G.; Johansson, J. M.; Lonn, M.; Jernas, M.; Olbers, T.; Peltonen, M.; Larsson, I.; Lonn, L.; Sjostrom, L.; Carlsson, B.; Carlsson, L. M. High expression of complement components in omental adipose tissue in obese men. *Obes. Res.* **2003**, *11* (6), 699–708.
- Linder, K.; Arner, P.; Flores-Morales, A.; Tollet-Egnell, P.; Norstedt, G. Differentially expressed genes in visceral or subcutaneous adipose tissue of obese men and women. *J. Lipid Res.* **2004**, *45* (1), 148–54.
- Vohl, M. C.; Sladek, R.; Robitaille, J.; Gurd, S.; Marceau, P.; Richard, D.; Hudson, T. J.; Tchernof, A. A survey of genes differentially expressed in subcutaneous and visceral adipose tissue in men. *Obes. Res.* **2004**, *12* (8), 1217–22.
- Gesta, S.; Bluher, M.; Yamamoto, Y.; Norris, A. W.; Berndt, J.; Kralisch, S.; Boucher, J.; Lewis, C.; Kahn, C. R. Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103* (17), 6676–81.
- van Beek, E. A.; Bakker, A. H.; Kruyt, P. M.; Hofker, M. H.; Saris, W. H.; Keijer, J. Intra- and interindividual variation in gene expression in human adipose tissue. *Pfluegers Arch.* **2007**, *453* (6), 851–61.
- MacLaren, R.; Cui, W.; Simard, S.; Cianflone, K. Influence of obesity and insulin sensitivity on insulin signaling genes in human omental and subcutaneous adipose tissue. *J. Lipid Res.* **2008**, *49* (2), 308–23.
- DeLany, J. P.; Floyd, Z. E.; Zvonic, S.; Smith, A.; Gravois, A.; Reiners, E.; Wu, X.; Kilroy, G.; Lefevre, M.; Gimble, J. M. Proteomic analysis of primary cultures of human adipose-derived stem cells: modulation by Adipogenesis. *Mol. Cell. Proteomics* **2005**, *4* (6), 731–40.
- Zvonic, S.; Lefevre, M.; Kilroy, G.; Floyd, Z. E.; DeLany, J. P.; Khetpal, I.; Gravois, A.; Dow, R.; White, A.; Wu, X.; Gimble, J. M. Secretome of primary cultures of human adipose-derived stem cells: modulation of serpins by adipogenesis. *Mol. Cell. Proteomics* **2007**, *6* (1), 18–28.
- Lanne, B.; Potthast, F.; Hoglund, A.; Brockenhuis von Lowenhielm, H.; Nyström, A. C.; Nilsson, F.; Dahllof, B. Thiourea enhances mapping of the proteome from murine white adipose tissue. *Proteomics* **2001**, *1* (7), 819–28.
- Sanchez, J. C.; Chiappe, D.; Converset, V.; Hoogland, C.; Binz, P. A.; Paesano, S.; Appel, R. D.; Wang, S.; Sennitt, M.; Nolan, A.; Cawthorne, M. A.; Hochstrasser, D. F. The mouse SWISS-2D PAGE database: a tool for proteomics study of diabetes and obesity. *Proteomics* **2001**, *1* (1), 136–63.
- Corton, M.; Botella-Carretero, J. I.; Lopez, J. A.; Camafeita, E.; San Millan, J. L.; Escobar-Morreale, H. F.; Peral, B. Proteomic analysis

- of human omental adipose tissue in the polycystic ovary syndrome using two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Hum. Reprod.* **2008**, *23* (3), 651–61.
- (18) Corton, M.; Villuendas, G.; Botella, J. I.; San Millan, J. L.; Escobar-Morreale, H. F.; Peral, B. Improved resolution of the human adipose tissue proteome at alkaline and wide range pH by the addition of hydroxyethyl disulfide. *Proteomics* **2004**, *4* (2), 438–41.
- (19) Yan, J. X.; Wait, R.; Berkelman, T.; Harry, R. A.; Westbrook, J. A.; Wheeler, C. H.; Dunn, M. J. A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis* **2000**, *21* (17), 3666–72.
- (20) Shevchenko, A.; Tomas, H.; Havlis, J.; Olsen, J. V.; Mann, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat. Protoc.* **2006**, *1* (6), 2856–60.
- (21) Schuerenberg, M.; Luebbert, C.; Eickhoff, H.; Kalkum, M.; Lehrach, H.; Nordhoff, E. Prestructured MALDI-MS sample supports. *Anal. Chem.* **2000**, *72* (15), 3436–42.
- (22) Suckau, D.; Resemann, A.; Schuerenberg, M.; Hufnagel, P.; Franzen, J.; Holle, A. A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *376* (7), 952–65.
- (23) Perkins, D. N.; Pappin, D. J.; Creasy, D. M.; Cottrell, J. S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **1999**, *20* (18), 3551–67.
- (24) Gorg, A.; Weiss, W.; Dunn, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* **2004**, *4* (12), 3665–85.
- (25) Unlu, M.; Morgan, M. E.; Minden, J. S. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* **1997**, *18* (11), 2071–7.
- (26) Alban, A.; David, S. O.; Bjorkesten, L.; Andersson, C.; Sloge, E.; Lewis, S.; Currie, I. A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics* **2003**, *3* (1), 36–44.
- (27) Wilkosz, S.; Ireland, G.; Khwaja, N.; Walker, M.; Butt, R.; de Giorgio-Miller, A.; Herrick, S. E. A comparative study of the structure of human and murine greater omentum. *Anat. Embryol.* **2005**, *209* (3), 251–61.
- (28) Kloting, N.; Graham, T. E.; Berndt, J.; Kralisch, S.; Kovacs, P.; Wason, C. J.; Fasshauer, M.; Schon, M. R.; Stumvoll, M.; Bluher, M.; Kahn, B. B. Serum retinol-binding protein is more highly expressed in visceral than in subcutaneous adipose tissue and is a marker of intra-abdominal fat mass. *Cell Metab.* **2007**, *6* (1), 79–87.
- (29) Schug, T. T.; Berry, D. C.; Shaw, N. S.; Travis, S. N.; Noy, N. Opposing effects of retinoic acid on cell growth result from alternate activation of two different nuclear receptors. *Cell* **2007**, *129* (4), 723–33.
- (30) Despres, J. P. Is visceral obesity the cause of the metabolic syndrome. *Ann Med* **2006**, *38* (1), 52–63.
- (31) Despres, J. P.; Lemieux, I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* **2006**, *444* (7121), 881–7.
- (32) van Hinsbergh, V. W.; Kooistra, T.; Scheffer, M. A.; Hajo van Bockel, J.; van Muijen, G. N. Characterization and fibrinolytic properties of human omental tissue mesothelial cells. Comparison with endothelial cells. *Blood* **1990**, *75* (7), 1490–7.
- (33) Moll, R.; Franke, W. W.; Schiller, D. L.; Geiger, B.; Krepler, R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* **1982**, *31* (1), 11–24.
- (34) Darimont, C.; Avanti, O.; Blancher, F.; Wagniere, S.; Mansourian, R.; Zbinden, I.; Leone-Vautravers, P.; Fuerholz, A.; Giusti, V.; Mace, K. Contribution of mesothelial cells in the expression of inflammatory-related factors in omental adipose tissue of obese subjects. *Int. J. Obes.* **2008**, *32* (1), 112–20.
- (35) Ozcan, U.; Cao, Q.; Yilmaz, E.; Lee, A. H.; Iwakoshi, N. N.; Ozdelen, E.; Tuneman, G.; Gorgun, C.; Glimcher, L. H.; Hotamisligil, G. S. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* **2004**, *306* (5695), 457–61.
- (36) Fernandez-Real, J. M.; Ricart, W. Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocr. Rev.* **2003**, *24* (3), 278–301.
- (37) Cheyssac, C.; Dina, C.; Lepretre, F.; Vasseur-Delannoy, V.; Dechaume, A.; Lobbens, S.; Balkau, B.; Ruiz, J.; Charpentier, G.; Pattou, F.; Joly, E.; Prentki, M.; Hansen, T.; Pedersen, O.; Vaxillaire, M.; Froguel, P. EIF4A2 is a positional candidate gene at the 3q27 locus linked to type 2 diabetes in French families. *Diabetes* **2006**, *55* (4), 1171–6.
- (38) Young, J. C.; Agashe, V. R.; Siegers, K.; Hartl, F. U. Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5* (10), 781–91.
- (39) Calderwood, S. K.; Khaleque, M. A.; Sawyer, D. B.; Ciocca, D. R. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem. Sci.* **2006**, *31* (3), 164–72.
- (40) Chung, J.; Nguyen, A. K.; Henstridge, D. C.; Holmes, A. G.; Chan, M. H.; Mesa, J. L.; Lancaster, G. I.; Southgate, R. J.; Bruce, C. R.; Duffy, S. J.; Horvath, I.; Mestril, R.; Watt, M. J.; Hooper, P. L.; Kingwell, B. A.; Vigh, L.; Hevener, A.; Febbraio, M. A. HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105* (5), 1739–44.
- (41) Kurucz, I.; Morva, A.; Vaag, A.; Eriksson, K. F.; Huang, X.; Groop, L.; Koranyi, L. Decreased expression of heat shock protein 72 in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes correlates with insulin resistance. *Diabetes* **2002**, *51* (4), 1102–9.
- (42) Chouchane, L.; Danguir, J.; Beji, C.; Bouassida, K.; Camoin, L.; Sfar, H.; Gabbouj, S.; Strosberg, A. D. Genetic variation in the stress protein hsp70–2 gene is highly associated with obesity. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **2001**, *25* (4), 462–6.
- (43) Zouari Bouassida, K.; Chouchane, L.; Jellouli, K.; Cherif, S.; Haddad, S.; Gabbouj, S.; Danguir, J. Polymorphism of stress protein HSP70–2 gene in Tunisians: susceptibility implications in type 2 diabetes and obesity. *Diabetes Metab.* **2004**, *30* (2), 175–80.
- (44) Hache, R. J.; Tse, R.; Reich, T.; Savory, J. G.; Lefebvre, Y. A. Nucleocytoplasmic trafficking of steroid-free glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (3), 1432–9.
- (45) Sumanasekera, W. K.; Tien, E. S.; Turpey, R.; Vanden Heuvel, J. P.; Perdew, G. H. Evidence that peroxisome proliferator-activated receptor alpha is complexed with the 90-kDa heat shock protein and the hepatitis virus B X-associated protein 2. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (7), 4467–73.
- (46) Mori, K. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* **2000**, *101* (5), 451–4.
- (47) Zhang, K.; Kaufman, R. J. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* **2008**, *454* (7203), 455–62.
- (48) Marcu, M. G.; Doyle, M.; Bertolotti, A.; Ron, D.; Hendershot, L.; Neckers, L. Heat shock protein 90 modulates the unfolded protein response by stabilizing IRE1alpha. *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *22* (24), 8506–13.
- (49) Nakatani, Y.; Kaneto, H.; Kawamori, D.; Yoshiuchi, K.; Hatazaki, M.; Matsuoka, T. A.; Ozawa, K.; Ogawa, S.; Hori, M.; Yamasaki, Y.; Matsuhisa, M. Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (1), 847–51.
- (50) Hosogai, N.; Fukuhara, A.; Oshima, K.; Miyata, Y.; Tanaka, S.; Segawa, K.; Furukawa, S.; Tochino, Y.; Komuro, R.; Matsuda, M.; Shimomura, I. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes* **2007**, *56* (4), 901–11.
- (51) Rane, M. J.; Pan, Y.; Singh, S.; Powell, D. W.; Wu, R.; Cummins, T.; Chen, Q.; McLeish, K. R.; Klein, J. B. Heat shock protein 27 controls apoptosis by regulating Akt activation. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (30), 27828–35.
- (52) Large, V.; Reynisdottir, S.; Langin, D.; Fredby, K.; Klannemark, M.; Holm, C.; Arner, P. Decreased expression and function of adipocyte hormone-sensitive lipase in subcutaneous fat cells of obese subjects. *J. Lipid Res.* **1999**, *40* (11), 2059–66.
- (53) Starowicz, K. M.; Cristino, L.; Matias, I.; Capasso, R.; Racioppi, A.; Izzo, A. A.; Di Marzo, V. Endocannabinoid dysregulation in the pancreas and adipose tissue of mice fed with a high-fat diet. *Obesity* **2008**, *16* (3), 553–65.
- (54) Spoto, B.; Fezza, F.; Parlango, G.; Battista, N.; Sgro, E.; Gasperi, V.; Zoccali, C.; Maccarrone, M. Human adipose tissue binds and metabolizes the endocannabinoids anandamide and 2-arachidonoylglycerol. *Biochimie* **2006**, *88* (12), 1889–97.
- (55) Di Marzo, V.; Matias, I. Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nat. Neurosci.* **2005**, *8* (5), 585–9.
- (56) Matias, I.; Di Marzo, V. Endocannabinoids and the control of energy balance. *Trends Endocrinol. Metab.* **2007**, *18* (1), 27–37.
- (57) Sipe, J. C.; Waalen, J.; Gerber, A.; Beutler, E. Overweight and obesity associated with a missense polymorphism in fatty acid amide hydrolase (FAAH). *Int. J. Obes.* **2005**, *29* (7), 755–9.
- (58) Furuhashi, M.; Hotamisligil, G. S. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2008**, *7* (6), 489–503.
- (59) Fisher, R. M.; Eriksson, P.; Hoffstedt, J.; Hotamisligil, G. S.; Thorne, A.; Ryden, M.; Hamsten, A.; Arner, P. Fatty acid binding protein expression in different adipose tissue depots from lean and obese individuals. *Diabetologia* **2001**, *44* (10), 1268–73.

- (60) Hertzel, A. V.; Bennaars-Eiden, A.; Bernlohr, D. A. Increased lipolysis in transgenic animals overexpressing the epithelial fatty acid binding protein in adipose cells. *J. Lipid Res.* **2002**, *43* (12), 2105–11.
- (61) Maeda, K.; Cao, H.; Kono, K.; Gorgun, C. Z.; Furuhashi, M.; Uysal, K. T.; Cao, Q.; Atsumi, G.; Malone, H.; Krishnan, B.; Minokoshi, Y.; Kahn, B. B.; Parker, R. A.; Hotamisligil, G. S. Adipocyte/macrophage fatty acid binding proteins control integrated metabolic responses in obesity and diabetes. *Cell Metab.* **2005**, *1* (2), 107–19.
- (62) Maeda, K.; Uysal, K. T.; Makowski, L.; Gorgun, C. Z.; Atsumi, G.; Parker, R. A.; Bruning, J.; Hertzel, A. V.; Bernlohr, D. A.; Hotamisligil, G. S. Role of the fatty acid binding protein mal1 in obesity and insulin resistance. *Diabetes* **2003**, *52* (2), 300–7.
- (63) Simpson, M. A.; LiCata, V. J.; Ribarik Coe, N.; Bernlohr, D. A. Biochemical and biophysical analysis of the intracellular lipid binding proteins of adipocytes. *Mol. Cell. Biochem.* **1999**, *192* (1–2), 33–40.
- (64) Makowski, L.; Boord, J. B.; Maeda, K.; Babaev, V. R.; Uysal, K. T.; Morgan, M. A.; Parker, R. A.; Suttles, J.; Fazio, S.; Hotamisligil, G. S.; Linton, M. F. Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis. *Nat. Med.* **2001**, *7* (6), 699–705.
- (65) Furuhashi, M.; Fucho, R.; Gorgun, C. Z.; Tuncman, G.; Cao, H.; Hotamisligil, G. S. Adipocyte/macrophage fatty acid-binding proteins contribute to metabolic deterioration through actions in both macrophages and adipocytes in mice. *J. Clin. Invest.* **2008**, *118* (7), 2640–50.
- (66) Ziouzenkova, O.; Orasanu, G.; Sharlach, M.; Akiyama, T. E.; Berger, J. P.; Viereck, J.; Hamilton, J. A.; Tang, G.; Dolnikowski, G. G.; Vogel, S.; Duester, G.; Plutzky, J. Retinaldehyde represses adipogenesis and diet-induced obesity. *Nat. Med.* **2007**, *13* (6), 695–702.

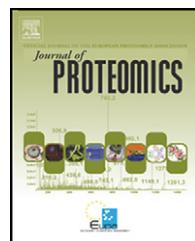
PR800942K



Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/jprot



# Attenuated metabolism is a hallmark of obesity as revealed by comparative proteomic analysis of human omental adipose tissue

Rafael Pérez-Pérez<sup>a,b</sup>, Eva García-Santos<sup>a,b</sup>, Francisco J. Ortega-Delgado<sup>b,c</sup>, Juan A. López<sup>d</sup>, Emilio Camafeita<sup>d</sup>, Wifredo Ricart<sup>b,c</sup>, José-Manuel Fernández-Real<sup>b,c</sup>, Belén Peral<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas, Alberto Sols, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) & Universidad Autónoma de Madrid, E-28029 Madrid, Spain

<sup>b</sup>CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN) ISCIII, Spain

<sup>c</sup>Department of Diabetes, Endocrinology and Nutrition, Hospital Dr. Josep Trueta, E-17007 Girona, Spain

<sup>d</sup>Unidad de Proteómica, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), E-28029 Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 5 August 2011

Accepted 22 September 2011

Available online 1 October 2011

### Keywords:

2D-DIGE

MALDI-MS

Obesity

Human adipose tissue

TKT

ACY-1

## ABSTRACT

Obesity is recognized as an epidemic health problem worldwide. In humans, the accumulation of omental rather than subcutaneous fat appears to be tightly linked to insulin resistance, type 2 diabetes and cardiovascular disease. Differences in gene expression profiles in the adipose tissue comparing non-obese and obese subjects have been well documented. However, to date, no comparative proteomic studies based on omental fat have investigated the influence of obesity in protein expression. In this work, we searched for proteins differentially expressed in the omental fat of non-obese and obese subjects using 2D-DIGE and MS. Forty-four proteins, several of which were further studied by immunoblotting and immunostaining analyses, showed significant differences in the expression levels in the two groups of subjects. Our findings reveal a clearly distinctive proteomic profile between obese and non-obese subjects which emphasizes: i) reduced metabolic activity in the obese fat, since most down-regulated proteins were engaged in metabolic pathways; and ii) morphological and structural cell changes in the obese fat, as revealed by the functions exerted by most up-regulated proteins. Interestingly, transketolase and aminoacylase-1 represent newly described molecules involved in the pathophysiology of obesity, thus opening up new possibilities in the study of obesity.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Obesity is one of the most important public health problems facing the world today and has increased dramatically over the last decades in children and adolescents [1]. Obese subjects suffer from decreased life quality and expectancy as well as

increased risk of suffering insulin resistance, type 2 diabetes, cardiovascular disease (CVD), hepatic steatosis, pulmonary and muscular pathologies, psychological disorders and cancer, among others [2]. A person's weight and body composition are likely determined by interaction between his/her genetic make-up and social, cultural, behavioral, and environmental factors.

\* Corresponding author at: Instituto de Investigaciones Biomédicas, Alberto Sols, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) & Universidad Autónoma de Madrid, Arturo Duperier 4, E-28029 Madrid, Spain. Tel.: +34 915854478; fax: +34 915854401.

E-mail address: bperal@iib.uam.es (B. Peral).

The intake of energy-dense foods, especially when combined with reduced physical activity, is very likely to contribute to the high prevalence of obesity; however, the existence of complex systems that regulate energy balance calls for a broader view of this paradigm [3].

In humans, the adipose tissue is dispersed throughout the body with major intra-abdominal depots around the omentum, intestines, and perirenal areas, as well as in subcutaneous depots in the buttocks, thighs, and abdomen. These two fat depots, the subcutaneous and the omental fat, exhibit unique biochemical and cellular properties, such as response to sex hormones, and different secretion profiles [4], including a different lipolytic program [5]. Moreover, the omental, but not the subcutaneous, fat drains directly into the portal circulation, and some data point out to excessive free fatty acid release from the omental adipose tissue in central obesity [6]. In fact, it is well established that the size of the omental, more than the subcutaneous, fat is strongly related to a higher risk of obesity-related co-morbidities, including insulin resistance, type 2 diabetes, dyslipidemia and CVD. As a consequence of extensive recent investigation, the adipose tissue is no longer regarded a mere fat reservoir, but an endocrine organ which cross-talks with other essential organs like the liver, the muscle, the pancreas, and the brain, being a crucial regulator of whole-body homeostasis.

Gene expression studies (i.e. microarrays and RT-PCR) using adipose tissue from obese and non-obese subjects have yielded important insights into the pathogenesis of obesity and related diseases, (reviewed in [7]). Results pointed out that: i) obesity represents a chronic inflammatory condition, since genes related with inflammation are up-regulated in response to obesity; ii) the differentiation state of obese adipocytes is altered; and iii) the expression of adipogenic genes is decreased in obesity [8–11]. As far as the latter is concerned, it has been suggested that the limited lipogenic and/or adipogenic capacity of obese adipocytes might lead to spillover of excess lipids to other tissues, and lipotoxicity could contribute to the pathogenesis of type 2 diabetes [12].

At the protein level the knowledge about human adipose tissue is limited. A very few proteomic studies have been published using either whole adipose tissue or isolated cells from both fat depots (reviewed in [13]). The majority of these works have studied human adipogenesis or adipose tissue secretome. Recently, however, our group and others have resorted to 2D-DIGE and MS to explore the differences between omental and subcutaneous fat [14–16]. Despite of some drawbacks inherent to 2-DE analysis (mainly the poor representation of low-abundant or very hydrophobic proteins as well as those with extreme pI and molecular weight), the quantitative comparison of proteins in two or more conditions based on 2D-DIGE/MS is a widespread, robust methodology to assess differential protein expression. This approach provides great analytical precision, dynamic range and sensitivity, therefore allowing a reproducible and reliable differential analysis [17]. Nevertheless, to date, no proteomic studies based on omental fat have investigated the influence of obesity in protein expression, given that the omental adipose tissue has been tightly linked to obesity-associated co-morbidities. In this work, we have compared for the first time the omental fat from non-obese and morbidly obese subjects by 2D-DIGE and MS, revealing 44 modulated

proteins in response to obesity. Our findings emphasize a noticeably decreased expression of proteins related to metabolic processes in response to obesity together with a down-regulation of mitochondrial enzymes, which is consistent with a reduced metabolic activity in the obese adipose tissue. In addition, most of the proteins found up-regulated in obesity develop structural functions in the cell, which account for the morphological changes undergone by obese adipocytes. Therefore, our results support a neatly distinctive biological profile in the omental fat of obese and non-obese subjects regarding protein expression.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study design

Omental fat from morbidly obese ( $n=6$ ) and non-obese ( $n=6$ ) subjects obtained during surgery were analyzed by a proteomic approach using 2D-DIGE. Samples were labelled using fluorophore dye-swapping to avoid labelling bias, combined in pairs and separated by electrophoresis. Image analysis revealed modulated proteins which were identified by MS. Results validation was performed by Western Blot with an additional set of subjects. Immunostaining assays were performed to study selected proteins not only in adipose tissue samples, but also in human omental adipocyte cultures. The 3T3-L1 cell line was used to study whether these proteins were modulated in the adipocyte differentiation process.

### 2.2. Biological samples

Omental adipose tissue samples were obtained from 26 women, including 12 non-obese and 14 morbidly obese. Non-obese subjects had a body mass index (BMI)  $<30 \text{ kg/m}^2$  (BMI ranged from 22.1 to  $28.3 \text{ kg/m}^2$ ), and age ranged from 25 to 56 years. Morbidly obese subjects had a BMI  $>40 \text{ kg/m}^2$  (BMI ranged from 40.7 to  $48.5 \text{ kg/m}^2$ ), and age ranged from 39 to 58 years. All these subjects had been submitted for elective surgical procedures (cholecystectomy, surgery of abdominal hernia and gastric by-pass surgery). During surgery, biopsies of adipose tissues were obtained after an overnight fast, washed in chilled 9 g/L NaCl solution, partitioned into pieces, and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until protein extraction. The surgeon aimed to obtain the samples from similar anatomical locations in all the subjects. All women were of Caucasian origin and reported that their body weight had been stable for at least three months before the study. None of the subjects had type 2 diabetes or any other systemic disease apart from obesity and all were free of any infections within the previous month before the study. Liver disease and thyroid dysfunction were specifically excluded by biochemical work-up. Other exclusion criteria for those patients included the following: 1) clinically significant hepatic, neurological, or other major systemic disease, including malignancy; 2) history of drug or alcohol abuse, defined as  $>80 \text{ g/day}$ , or serum transaminase activity more than twice the upper normal range limit; 3) elevated serum creatinine concentrations; 4) acute major cardiovascular event in the previous 6 months; 5) acute illnesses and current evidence of chronic inflammatory or

infectious diseases; and 6) mental illness rendering the subjects unable to understand the nature, scope, and possible consequences of the analysis. The study was conducted according to the recommendations of the Declaration of Helsinki and was approved by the ethics committees of Hospital Dr. Josep Trueta (Girona, Spain). Signed informed consent was obtained from all subjects.

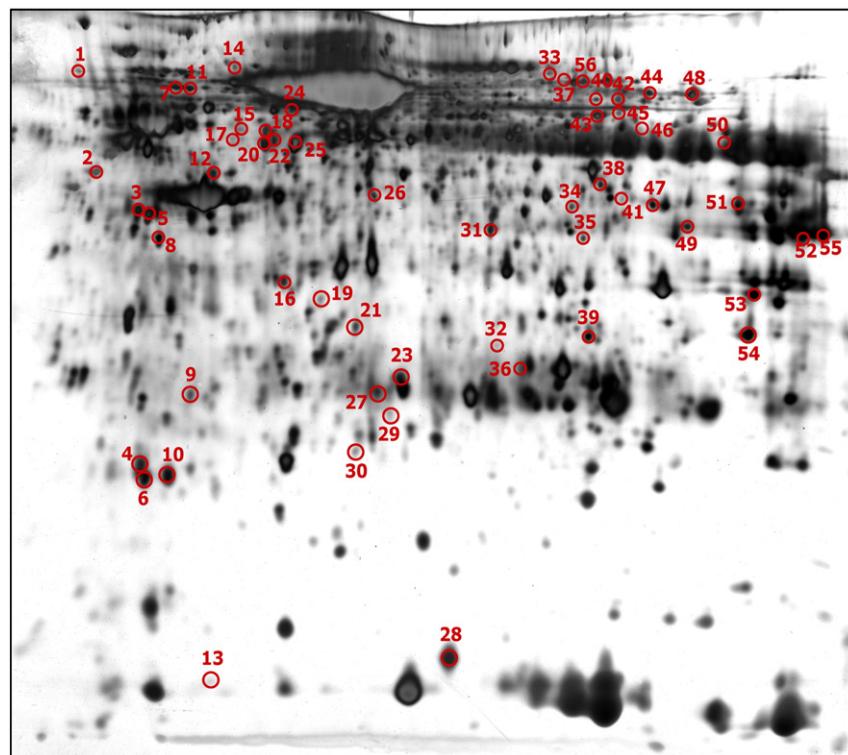
### 2.3. 2D-DIGE analysis

Proteins were extracted from omental adipose tissue biopsies (100 mg) by using the 2D Grinding Kit (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) in Lysis Buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, and 30 mM Tris-HCl pH 8.5) containing 50 mM DTT. The extract was shaken for 30 min at room temperature and centrifuged at 15,000×g for 30 min. Proteins were precipitated with the 2D-CleanUp Kit (GE Healthcare) and redissolved in Lysis Buffer. The protein concentration was determined using RC/DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Proteins were labelled according to the manufacturer's instruction (GE Healthcare). Briefly, 50 µg of adipose tissue protein extracts was minimally labelled with 400 pmol of the N-hydroxysuccinimide esters of Cy3 or Cy5 fluorescent cyanine dyes on ice in the dark for 30 min. All experiments comprised an internal standard containing equal amounts of each cell lysate, which was labelled with Cy2 dye. The labelling reaction was quenched

with 1 µl of 10 mM lysine on ice in the dark for 10 min. The internal standard and the individual omental fat extracts from non-obese and obese subjects were combined and run in a single gel (150 µg total proteins). Proteins extracts were diluted in Rehydration Buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 0.8% (v/v) IPG buffer 3-11NL), reduced with 50 mM DTT, and applied by cup-loading to 24 cm IPG strips pH 3-11NL, which were previously rehydrated with Rehydration Buffer containing 100 mM hydroxyethyl disulfide (DeStreak, GE Healthcare). The first and second dimensions together with the equilibration step were performed following the procedure previously described [14].

### 2.4. Image acquisition and analysis

After SDS-PAGE, gels were scanned with a Typhoon 4100 scanner (GE Healthcare) at 100 µm resolution using appropriate individual excitation and emission wavelengths, filters and photomultiplier (PMT) sensitivity for each Cy2, Cy3 and Cy5 dyes (PMT values: 510, 510 and 475 respectively). Gel images were analyzed with the DIA (Differential in-gel Analysis) module of the DeCyder v7 software (GE Healthcare) for automatic spot detection, background subtraction, quantification and normalization with low experimental variation (DeCyder Differential Analysis Software User Manual, version 7; GE Healthcare, 2009). The Biological Variation Analysis (BVA) module utilized those images individually processed with the DIA module to



**Fig. 1 – Representative silver stained 2D gel of omental adipose tissue proteins using 24 cm pH3-11NL (left to right) strips in the first dimension and 12% PAGE-SDS gels in the second dimension. Numbers correspond to differentially expressed protein spots as indicated in Table 1. Supplemental Fig. 1 provides a more convenient visualization of the differential protein spots on the silver stained 2D gel.**

**Table 1 – Proteins identified by MALDI-MS showing significantly regulated expression in the omental fat from obese and non-obese individuals.**

Spot <sup>a</sup>	p-value <sup>b</sup>	Av. ratio <sup>c</sup>	Accession <sup>d</sup>	Locus <sup>e</sup>	Name	Protein					Score <sup>f</sup>	Expect <sup>g</sup>	Ions score <sup>h</sup>	kDa theor <sup>i</sup>	pi theor <sup>j</sup>	Match pept <sup>k</sup>	Cover % <sup>l</sup>
						Mascot											
1	1.6E-02	1.6	gi 642524	AAA85268	Lumican	191	7.90E-13	102	38.7	6.2	5	14					
2	8.0E-03	-2.0	gi 62414289	NP_003371	Vimentin	273	4.90E-21		53.7	5.1	19	47					
3	1.2E-02	2.2	gi 24234699	NP_002267	Keratin 19	372	6.30E-31	157	44.1	5.0	18	43					
4	1.4E-02	2.2	gi 42734430	NP_036364	Polymerase I and transcript release factor	164	3.90E-10	73	43.5	5.5	6	12					
5	3.9E-03	2.2	gi 24234699	NP_002267	Keratin 19	257	2.00E-19		44.1	5.0	16	39					
6	3.0E-02	1.7	gi 42734430	NP_036364	Polymerase I and transcript release factor	129	2.80E-08	82	43.5	5.5	6	11					
7	2.1E-02	1.5	gi 18645167	AAH23990	Annexin A2	136	5.60E-09		38.8	7.6	9	28					
			gi 167614506	NP_002289	L-plastin	235	3.10E-17	137	70.8	5.3	11	22					
			gi 2897116	AAC397038	Integrin alpha-7	157	2.00E-09	85	125.4	5.6	9	10					
8	3.6E-02	2.1	gi 50415798	AAH78178	lamin-B1	129	1.20E-06		38.3	5.4	9	30					
9	3.3E-02	1.7	gi 55962552	CAI18465	Heat shock 70 kDa protein 1A	181	7.80E-12	85	52.2	5.4	7	13					
10	4.2E-02	1.6	gi 3127926	CAA36267	collagen type VI, alpha 3 chain	89	1.30E-02	91	345.1	6.4	8	3					
			gi 42734430	NP_036364	Polymerase I and transcript release factor	157	2.00E-09	74	43.5	5.5	6	12					
11	5.5E-03	1.8	gi 62898171	BAD97025	L-plastin variant	240	9.90E-18	103	70.8	5.2	10	18					
12	2.0E-02	1.6	gi 119626083	EAX05678	Albumin, isoform CRA_t	168	1.60E-10		60.2	6.7	14	27					
13	1.2E-02	2.1	gi 4506925	NP_003013	SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like	87	4.60E-04	69	12.8	5.2	1	8					
14	4.7E-02	1.4	gi 42476013	NP_940916	NHL repeat containing 2	114	3.90E-05	57	80.2	5.3	4	6					
15	6.3E-03	2.6	gi 25777732	NP_000681	Mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 precursor	312	6.30E-25	149	56.9	6.6	11	22					
16	4.3E-02	-1.5	gi 91992949	AAI14619	Guanine nucleotide-binding protein beta subunit	161	7.80E-10	77	37.1	5.6	5	16					
17	3.0E-02	1.6	gi 181573	AAA35763	Cytokeratin 8	147	2.00E-08	82	53.5	5.5	5	10					
18	5.8E-05	2.7	gi 67782365	NP_005547	Keratin 7	293	4.90E-23	133	51.4	5.4	15	30					
19	2.2E-02	1.5	gi 4096652	AAC99987	Aryl sulfotransferase	102	1.40E-05	82	34.3	5.8	1	3					
20	2.7E-03	2.0	gi 2781209	1FZA_C	Fibrinogen gamma chain	240	9.90E-18	128	36.5	5.9	7	33					
21	3.1E-02	1.9	gi 4502101	NP_000691	Annexin I	187	2.00E-12	105	38.9	6.6	5	17					
22	3.1E-03	2.3	gi 1419564	CAA67203	Keratin 8, isoform CRA_d	115	3.10E-05	81	30.8	5.0	2	8					
23	1.9E-03	-2.1	gi 662841	AAAA62175	Heat shock protein 27	126	2.50E-06	93	22.4	7.8	2	13					
24	4.8E-03	1.6	gi 168988718	2VDB_A	Serum albumin	161	7.80E-10		67.8	5.6	12	18					
25	1.1E-03	2.6	gi 237823916	3GHG_C	Chain C, human fibrinogen	396	2.50E-33	216	47.0	5.5	14	51					
26	2.0E-03	-1.5	gi 181573	AAA35763	Cytokeratin 8	366	2.50E-30	186	53.5	5.5	15	37					
27	1.6E-03	1.5	gi 4501901	NP_000657	Aminoacylase 1	190	9.90E-13	60	46.1	5.8	8	18					
28	1.2E-02	-1.7	gi 4557581	NP_001435	Annexin A2	185	3.10E-12	69	38.8	7.6	7	20					
					Fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)	277	2.00E-21	88	15.5	6.6	10	68					

29	3.1E-02	1.8	gi 119626066	EAX05661	Albumin, isoform CRA_c	141	7.80E-08	27.7	6.4	8	30
30	4.4E-02	1.9	gi 17389815	AAH17917	Triosephosphate isomerase 1	131	7.80E-07	26.9	6.5	7	32
31	1.1E-02	-1.7	gi 4557233	NP_000008	Short-chain acyl-CoA dehydrogenase precursor	119	1.20E-05	44.6	8.1	7	19
32	3.9E-02	-1.5	gi 157168362	NP_000261	Nucleoside phosphorylase	123	4.90E-06	71	32.3	6.5	3
33	3.1E-02	-1.8	gi 110590599	2HAV_A	Serotransferrin precursor	119	1.20E-05	77.0	6.9	9	17
34	6.3E-03	-1.5	gi 4557231	NP_000007	Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase isoform a precursor	158	1.60E-09	91	47.0	8.6	4
35	2.1E-03	-1.5	gi 119631279	EAX10874	3-hydroxyisobutyryl-coenzyme A hydrolase, isoform CRA_b	159	1.20E-09	49.4	9.4	9	23
36	3.2E-02	-1.5	gi 4502517	NP_001729	Carbonic anhydrase I	141	1.80E-09	72	28.9	6.6	4
37	3.1E-02	1.4	gi 27436946	NP_733821	Lamin A/C isoform 1 precursor	521	7.80E-46	232	74.4	6.6	22
38	4.8E-03	-1.5	gi 119590499	EAW70093	Fumarate hydratase, isoform CRA_d	174	3.90E-11	136	46.6	6.9	2
39	6.0E-05	-1.7	gi 189181759	NP_001121188	electron transfer flavoprotein, alpha polypeptide isoform b	167	4.50E-12	93	30.2	8.8	4
40	4.3E-02	-1.4	gi 4557735	NP_000231	Monoamine oxidase A	126	2.50E-06	69	60.2	7.9	4
41	1.0E-02	-1.9	gi 305833667	AAP36082	Citrate synthase	109	1.20E-04	69	29.6	7.8	2
42	1.1E-02	-1.6	gi 71296885	AAH44787	Monoamine oxidase A	146	2.50E-08	66	60.2	6.9	6
43	4.3E-03	-1.4	gi 4557014	NP_001743	Catalase	278	1.60E-21	115	59.9	6.9	25
44	1.3E-02	-1.5	gi 3888891	AAA61222	Transketolase	150	9.90E-09	68.5	7.9	10	22
45	3.2E-03	-1.6	gi 179950	AAB59522	Catalase	195	3.10E-13	70	51.6	7.8	8
46	3.1E-03	-1.8	gi 223002	040173A	Fibrin beta	170	9.90E-11	51.4	8.0	10	26
47	1.4E-04	-1.6	gi 48257138	AAH00105	Citrate synthase, mitochondrial precursor	211	7.80E-15	101	45.8	6.5	6
48	3.0E-02	-1.7	gi 388891	AAA61222	Transketolase	178	1.60E-11	68.5	7.9	10	25
49	1.0E-02	-1.5	gi 4557237	NP_000010	Acetyl-coenzyme A acetyltransferase 1 precursor	129	1.20E-06	95	45.5	9.0	2
50	8.8E-03	-1.5	gi 13111901	AAH03119	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial precursor	101	1.80E-05	86	40.4	8.9	1
51	1.8E-02	-1.4	gi 16950633	NP_446464	Argininosuccinate synthetase 1	180	9.90E-12	49	46.8	8.1	7
52	1.7E-02	-1.7	gi 598443	AAB48003	Alcohol dehydrogenase beta-3 subunit	220	9.90E-16	40.7	8.5	12	32
53	2.7E-02	2.0	gi 4757756	NP_004030	Annexin A2 isoform 2	283	4.90E-22	87	38.8	7.6	15
54	1.9E-02	-1.6	gi 119626625	EAX06220	L-3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase short chain isoform CRA_LC	170	9.90E-11	78	7.6	9.3	4
55	4.1E-02	-1.6	gi 598443	AAB48003	Alcohol dehydrogenase beta-3 subunit	212	6.20E-15	63	40.7	8.5	10
56	3.5E-02	-1.5	gi 40807491	NP_001986	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	306	2.50E-24	141	78.9	6.8	11

<sup>a</sup>Spot numbering as shown in 2-DE silver gel in Fig. 1. <sup>b</sup>p-value of the Student's t test and <sup>c</sup>average volumen ratio (obese/non-obese) as calculated by the DeCyder analysis. <sup>d</sup>Protein and <sup>e</sup>locus accession codes from the NCBI nr database. <sup>f</sup>Mascot score, <sup>g</sup>Mascot expected value, <sup>h</sup>Mascot ion score, <sup>i</sup>theoretical molecular weight (kDa) and <sup>j</sup>pI, <sup>k</sup>number of matched peptides and <sup>l</sup>protein sequence coverage for the most probable candidate as provided by Mascot. Protein identification details (MS and MS/MS spectra) are listed in Supplemental Table 1.

<sup>a</sup>Spot numbering as shown in 2-DE silver gel in Fig. 1. <sup>b</sup>p-value of the Student's t test and <sup>c</sup>average volumen ratio (obese/non-obese) as calculated by the DeCyder analysis. <sup>d</sup>Protein and <sup>e</sup>locus accession codes from the NCBI nr database. <sup>f</sup>Mascot score, <sup>g</sup>Mascot expected value, <sup>h</sup>Mascot ion score, <sup>i</sup>theoretical molecular weight (kDa) and <sup>j</sup>pI, <sup>k</sup>number of matched peptides and <sup>l</sup>protein sequence coverage for the most probable candidate as provided by Mascot. Protein identification details (MS and MS/MS spectra) are listed in Supplemental Table 1.

match protein spots across gels, using the internal standard for gel-to-gel matching. Statistical analysis was then carried out to determine protein expression changes. P-values lower than 0.05 as calculated from Student's t test were considered significant. Multivariate analysis was performed by Principal Components Analysis (PCA) using the algorithm included in the Extended Data Analysis (EDA) module of the DeCyder software based on the spots matched across all gels.

### 2.5. In-gel trypsin digestion and mass spectrometry

Protein spots showing significantly altered expression levels in the 2 groups of samples by DeCyder Software were selected for gel excision from silver-stained gels, digested automatically on a Proteineer DP robot (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) using the protocol of [18] and analyzed in an Ultraflex MALDI TOF/TOF mass spectrometer (Bruker Daltonik) [19] to obtain the corresponding MALDI-MS and MALDI-MS/MS spectra. In a first step, MALDI-MS spectra were acquired by averaging 300 individual spectra in the positive ion reflector mode at 50 Hz laser frequency in a mass range from 800 to 4000 Da. In a second step, precursor ions showing in the MALDI-MS mass spectrum were subjected to fragment ion analysis in the tandem (MS/MS) mode to average 1000 spectra. Peak labelling, internal calibration based on two trypsin autolysis ions with  $m/z=842.510$  and  $m/z=2211.105$ , as well as removal of known trypsin and keratin peptide masses were performed automatically using the flexAnalysis 2.2 software (Bruker Daltonik). No smoothing or any further spectral processing was applied. MALDI-MS and MS/MS spectra were manually inspected in detail and reacquired, recalibrated and/or relabelled using the aforementioned programs and homemade software when necessary.

### 2.6. Database searching

MALDI-MS and MS/MS data were combined through the BioTools 3.0 program (Bruker Daltonik) to search a nonredundant protein database (NCBInr 20091022;  $\sim 7.0 \times 10^6$  entries; National Centre for Biotechnology Information, Bethesda, USA), using the Mascot 2.2 software (Matrix Science, London, UK; <http://www.matrixscience.com>) [20]. Other relevant search parameters were set as follows: enzyme, trypsin; fixed modifications, carbamidomethyl (C); allow up to 1 missed cleavage; peptide tolerance  $\pm 20$  ppm; MS/MS tolerance  $\pm 0.5$  Da. Protein scores greater than 81 were considered significant ( $p < 0.05$ ).

### 2.7. Cell culture and adipocyte differentiation

Isolated human omental pre-adipocytes (Zen-Bio, Inc. Raleigh, NC, USA) were cultured with omental pre-adipocytes medium (Zen-Bio, Inc.) at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> and differentiated using omental differentiation medium (Zen-Bio, Inc.) according to the method outlined by Ortega et al. [21]. Two weeks after the initiation of differentiation, cells appeared rounded with large lipid droplets in the cytoplasm and were considered mature adipocytes. Murine 3T3-L1 fibroblasts (CCL 92.1, American Type Culture Collection) were grown to confluence in DMEM containing 10% calf serum. The differentiation to adipocytes was induced according to the procedure described by Ortega et al.

[21]. On days 0, 3, 5 and 9, three replicated cell samples were separately collected for later immunoassays.

### 2.8. Immunoblotting analysis

Fat tissue or cultured cells were homogenized in radioimmuno precipitation assay (RIPA) buffer as described in [14]. Protein extracts (ca. 10 µg) were loaded, resolved on SDS-PAGE and transferred to Hybond ECL nitrocellulose membranes by conventional procedures. Membranes were stained with 0.15% Ponceau red (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) to ensure equal loading after transfer and then blocked with 5% (w/v) BSA or dried nonfat milk in TBS buffer with 0.1% Tween 20. The antibodies used for Western Blot analysis revealed in each case single bands at the expected molecular masses. The primary antibodies used were: 1:2000 rabbit anti-TKT (HPA029480), and 1:2000 rabbit anti-ACY-1 (A6609) (Sigma-Aldrich); 1:2000 goat anti-Beta-actin (sc-1616); 1:4000 rabbit anti-SPHK1 (sc-48825), and 1:200 goat anti-FABP5 (sc-16060) (Santa Cruz Biotechnology); 1:1000 mouse anti-HSP70 (C92F3A-5) (Stressgen Bioreagents); 1:500 rabbit anti-FABP4 (Eurogentec, Seraing, Belgium). Blots were incubated with the appropriate IgG-HRP-conjugated secondary antibody. Immunoreactive bands were visualized with ECL-plus reagent kit (GE Healthcare). Blots were exposed for different times; exposures in the linear range of signal were selected for densitometric evaluation. Optical densities of the immunoreactive bands were measured using Image J analysis software. Statistical comparisons of the densitometry data were carried out using the Student's t test for samples, and results were expressed as means  $\pm$  standard deviation (SD) using SPSS 16.0 (SPSS Inc., Illinois, USA). Statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

### 2.9. Immunohistochemistry

Five-micron sections of formalin-fixed paraffin-embedded adipose tissue were deparaffinised and rehydrated prior to antigen unmasking by boiling in 1 mM EDTA, pH 8. Sections were blocked in normal serum and incubated overnight with rabbit anti-TKT (1:500 dilution) or rabbit anti-ACY-1 (1:200 dilution) antibodies. Secondary antibody staining was performed using the VECTASTAIN ABC kit (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA) and detected with diaminobenzidine (DAB, Vector Laboratories, Inc.). Sections were counterstained with hematoxylin prior to dehydration and coverslip placement, and examined under a Nikon Eclipse 90i microscope. As a negative control, the procedure was performed in the absence of primary antibody.

### 2.10. Immunofluorescence

Frozen adipose tissue sections or cultured cells were fixed with 4% paraformaldehyde and permeabilized for 30 min with 0.1% Triton X-100 in PBS. Staining was performed overnight at 4 °C with rabbit anti-TKT (1:500 dilution) or with rabbit anti-ACY-1 (1:400 dilution) antibodies, washed, and visualized using Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit antibody (1:500; Molecular Probes Inc., OR, USA). The slides were counterstained with DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) to reveal nuclei. The lipophilic fluorescence dye BODIPY 493/503 was used for lipid droplet labelling according to the manufacturer's instruction (Molecular Probes Inc.). The slides were examined under a Leica TCS SP5

fluorescent microscope (Heidelberg, Germany). As a negative control, the assay was performed in the absence of primary antibody.

### 3. Results

#### 3.1. Proteomic analysis of obese and non-obese adipose tissue samples

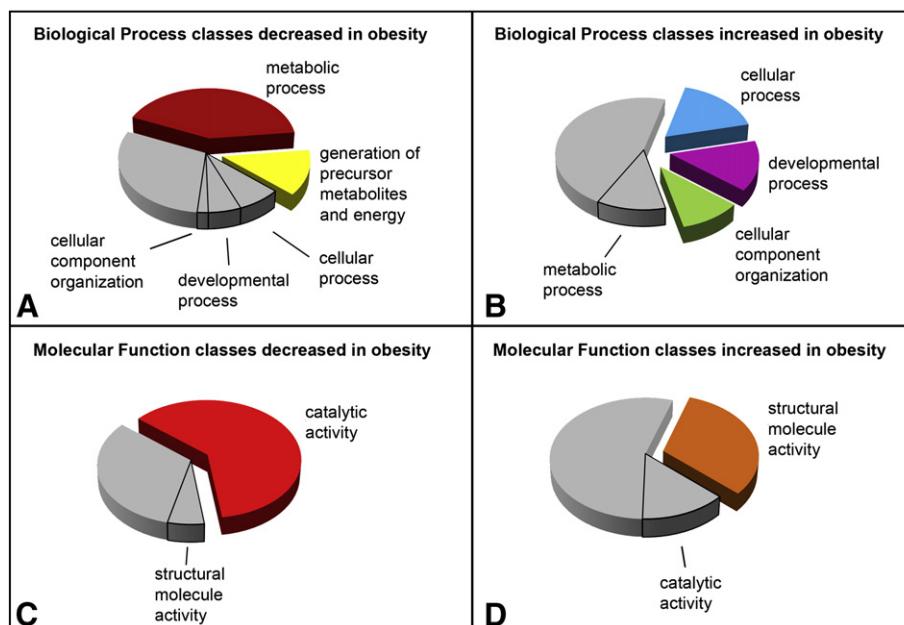
To detect proteins differentially expressed in obesity, omental fat samples from morbidly obese ( $n=6$ ) and non-obese ( $n=6$ ) females were analyzed by 2D-DIGE. Protein extracts were labelled using dye-swapping with either Cy3 or Cy5 fluorescent dye to avoid labelling bias arising from the fluorescence properties of gels at different wavelengths. Then each Cy3/Cy5-labelled sample pair was mixed with a Cy2-labelled internal standard and loaded onto each gel. After 2-DE, the Cy2, Cy3 and Cy5 channels were individually imaged from each gel (Supplemental Fig. 1). Automated image analysis performed with DeCyder software detected approximately 2700 spots per gel in the 3–11 NL pH range with a molecular mass of 10–150 kDa, of which 1200 spots were matched throughout all gels. Multivariate PCA showed that the “non-obese group” was efficiently discriminated from the “obese group” (data not shown). DeCyder statistical analyses showed that 70 protein spots were differentially expressed at  $p<0.05$  considering only those spots present in all gels. These spots were excised from silver-stained gels, digested with trypsin, and analyzed by MALDI-MS followed by database search. Fifty-six spots, which corresponded to 44

unique proteins could be identified (Fig. 1 and Table 1). Twenty proteins were increased and 24 decreased in response to obesity.

#### 3.2. Functional classification of the proteins differentially expressed

To understand the biological relevance of protein expression changes in response to obesity, the Protein Analysis Through Evolutionary Relationship (PANTHER) application (<http://www.pantherdb.org/>) was used. This classification system uses information on protein sequence to assign a gene to an ontology group on the basis of the Gene Ontology (GO) terms <http://www.geneontology.org/>. Thus, the two sets of up- and down-regulated proteins were searched for significantly over-represented ( $p<0.05$ ) GO terms. Two key Biological Process classes were found significantly enriched in the group of down-regulated proteins: Metabolic Process and Generation of Precursor Metabolites and Energy, while three key Biological Process classes (Cellular Process, Developmental Process and Cellular Component Organization) were significantly enriched in the set of up-regulated proteins. Likewise, the categorization based on the Molecular Function GO category showed that most down-regulated proteins accounted for one key significant class, Catalytic Activity, while Structural Molecule Activity revealed as the unique key GO term with significant enrichment in the up-regulated proteins from obese adipose tissue (Fig. 2).

In addition, PANTHER application mapped the 44 differentially expressed proteins into parent and child categories with regard to their Molecular Function and Biological Process GO



**Fig. 2 – Pie chart representations of PANTHER Biological Process and Molecular Function classes significantly over-represented in the set of downregulated proteins (A, C) and in the set of up-regulated proteins (B, D) in obesity. Classes with no significant P-value are displayed in grey colour for comparative purposes (note that the class Generation of Precursor Metabolites and Energy has no representation in the group of proteins increased in obesity). It should be pointed that PANTHER may attribute multiple classes to a given protein.**

terms (Supplementary Table 2), highlighting that most of the down-regulated proteins were engaged in metabolic pathways. Our results have also revealed that the set of down-regulated proteins comprised numerous (14 out of 24, 58%) mitochondrial enzymes, overall supporting a reduced metabolic activity in the obese adipose tissue.

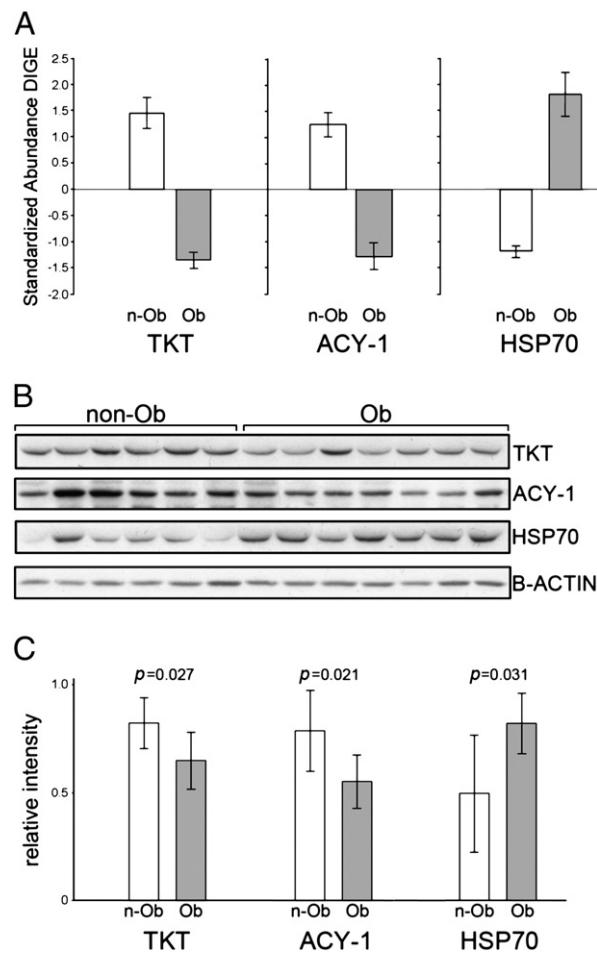
### 3.3. Validation of differential protein expression

Western Blot analyses were performed in an additional set of non-obese and morbidly obese women for two proteins whose expression in human adipose tissue had not been previously documented, TKT and ACY-1, together with two molecules, HSP70 and FABP5 that had been earlier studied in fat and/or in obesity and related co-morbidities. One of these proteins was shown up-regulated (HSP70) and the other three were found down-regulated (TKT, ACY-1 and FABP5) in response to obesity. Immunoblotting analysis using an antibody against TKT confirmed that this protein was over-expressed ( $p<0.05$ ) in the non-obese group of subjects, confirming 2-DE findings (Fig. 3). Likewise, ACY-1 levels were significantly more abundant ( $p<0.05$ ) in the non-obese subjects (Fig. 3), in agreement with 2D-DIGE results. Both TKT and ACY-1 were studied by immunostaining methods, as well as in the adipocyte differentiation process. Immunoblotting analysis revealed that HSP70 was significantly increased in obese vs. non-obese individuals ( $p<0.05$ ), thus confirming 2D-DIGE results (Fig. 3). By using an antibody anti-FABP5, immunoblotting analysis revealed an over-expression of FABP5 protein in the omental adipose tissue from non-obese compared to obese subjects; however this result did not reach statistical significance ( $p=0.06$ ) mostly due to the high SD observed in non-obese samples (data not shown). It must be noted that Western Blot assay may fail to validate particular protein isoforms found differentially expressed by 2D-DIGE/MS as they rely on antibodies lacking the necessary specificity.

### 3.4. Immunostaining analyses

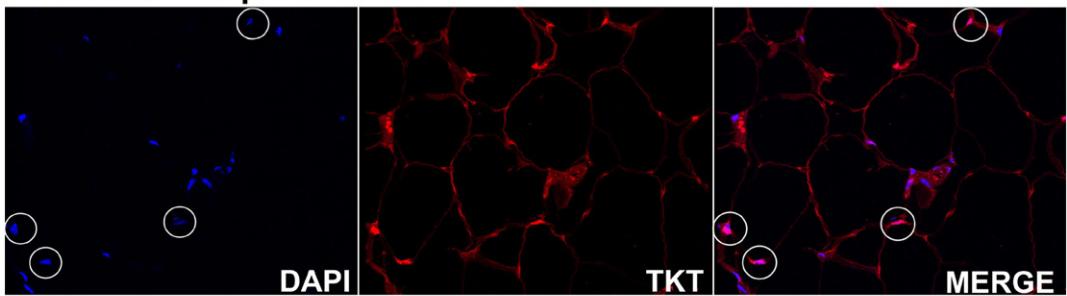
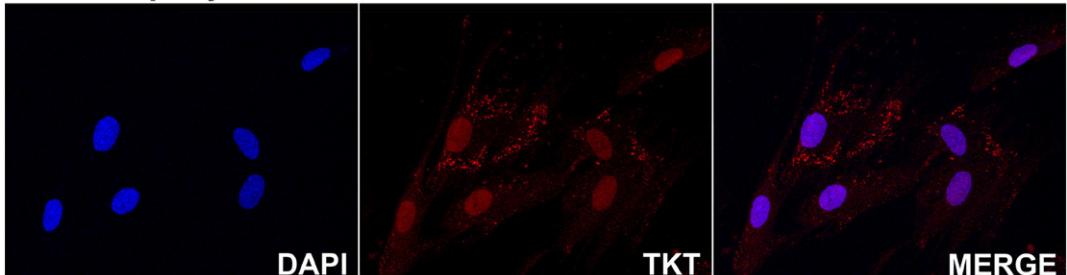
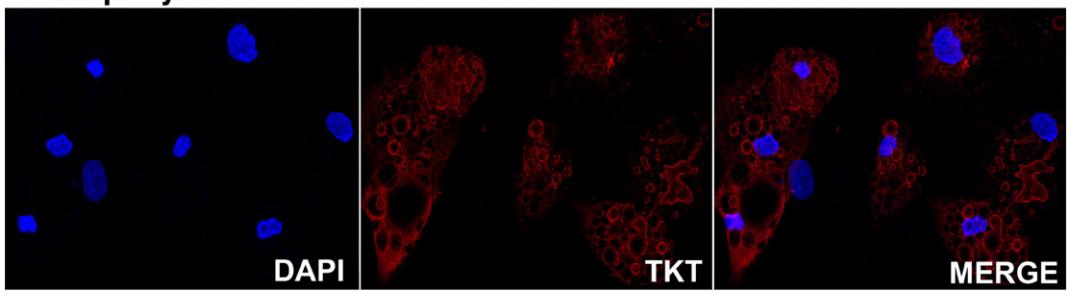
Immunohistochemical and immunofluorescence approaches were performed to determine the cellular distribution of TKT and ACY-1 proteins in biopsies of omental fat given that, as far as we know, these proteins have not been earlier analyzed in this tissue. TKT was assayed in sections of omental adipose tissue by both techniques revealing similar results. Immunofluorescence detection showed a bright staining pattern mainly in the cytoplasm of adipocytes and of stromal-vascular fraction (SVF) cells, as well as in the nuclei of a few cells (Fig. 4A). To determine whether the stained nuclei pertained to adipocytes, immunofluorescence analysis from a cellular culture of human pre-adipocytes and differentiated adipocytes was performed. This analysis showed that in pre-adipocytes TKT was localized in the cytoplasm as well as in the nucleus, while in adipocytes only the cytoplasm but not the nucleus was stained (Fig. 4B and C). TKT expression was also confirmed in adipose tissue macrophages by co-staining assays using CD68 (not shown).

ACY-1 was also assayed in sections of omental fat by immunostaining analyses, which showed that ACY-1 was expressed in the cytoplasm as well as in the nucleus of



**Fig. 3 – TKT, ACY-1 and HSP70 expression in human omental adipose tissue.** Standardized abundance was determined by DeCyder analysis of 2D-DIGE data from non-obese and obese fat samples. The (+) and (-) symbols indicate increased and decreased levels with respect to the internal standard, respectively (A). Representative Western Blot analysis of TKT, ACY-1 and HSP70 expression from non-obese and obese fat samples. The results were normalized for B-actin density (B). Values for relative intensity obtained after densitometry of the bands are means  $\pm$  SD (C). Representative images of four independent analyses.

adipocytes and SVF cells, including omental mesothelial cells (Supplemental Fig. 2A and 2B). Immunofluorescence analysis revealed the presence of ACY-1 in the nucleus of cultured human omental pre-adipocytes (Fig. 5A), while in differentiated adipocytes ACY-1 localized around cytosolic lipid droplets and, to a lesser extent, in the nucleus (Fig. 5B and 5C). In addition, we had also performed immunofluorescence analysis in 3T3-L1 cells during the adipogenic process. As illustrated in Supplemental Fig. 3A, ACY-1 was localized exclusively in 3T3-L1 fibroblast nuclei (day 0), as was the case for human pre-adipocytes; however, in 3T3-L1 differentiated adipocytes (day 9), ACY-1 was shown around lipid droplets in the cytoplasm, as well as in the majority of the nuclei (Supplemental Fig. 3B and 3C).

**A. Omental Adipose Tissue****B. Preadipocytes****C. Adipocytes**

**Fig. 4 – Immunofluorescence staining of TKT in human omental adipose tissue, human pre-adipocytes and human adipocytes differentiated in vitro.** In fat biopsies TKT is mainly shown in the cytosol of adipocytes and other SVF cells, but is also observed in the nuclei of a few cells (four white circles) (A). In human pre-adipocytes TKT is shown both in the cytoplasm and the nucleus (B). In human differentiated adipocytes TKT is exclusively observed in the cytosol (C). Images are representative of adipose tissue sections collected from three subjects (A) and three replicates (B and C).

### 3.5. 3T3-L1 adipogenesis

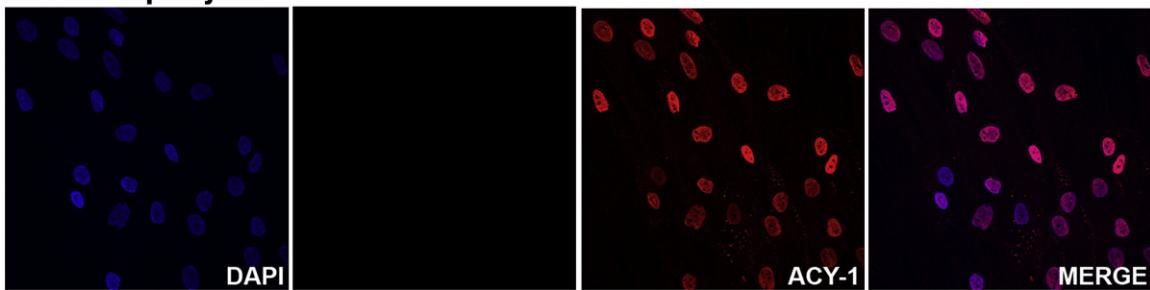
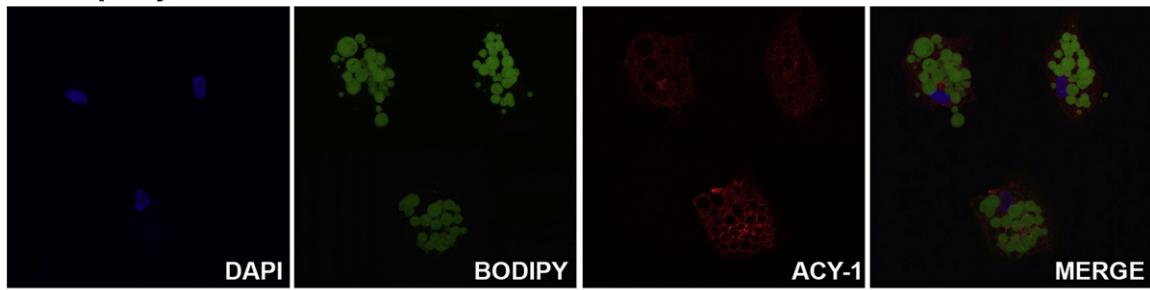
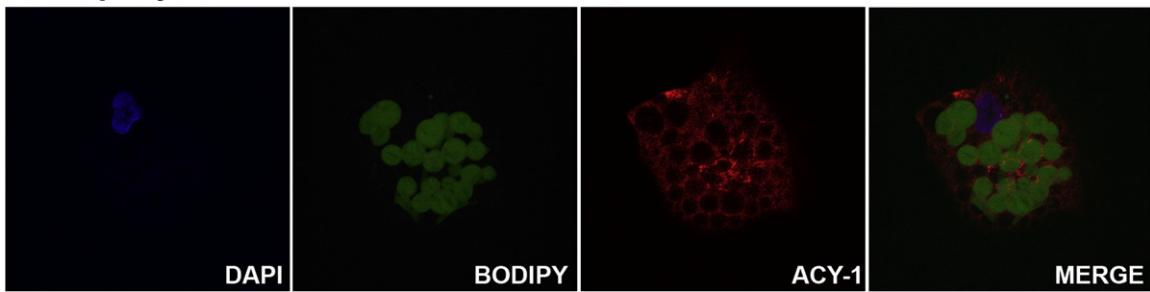
To further study TKT and ACY-1 proteins, we performed immunoblotting analysis with proteins extracted during the adipogenic maturation of 3T3-L1 cells using the previously described specific antibodies. TKT and ACY-1 were significantly augmented with adipocyte differentiation in parallel to the expression of FABP4, which was used as an adipogenesis control (Fig. 6).

## 4. Discussion

Over the last years an increasing number of studies have focused in the analysis of gene expression to gain insight into obesity and related pathologies. However only a few number of studies have resorted to proteomic methods to identify human fat proteins associated to these disorders. In the present study we have employed a proteomic approach based on 2D-DIGE and MALDI-MS to uncover differences in protein expression using biopsies of omental fat from non-obese and

morbidly obese individuals, reporting for the first time a set of 44 proteins that are significantly modulated in these two sets of subjects. Our study has focused on omental adipose tissue as this fat depot has been long associated with augmented risk of suffering pathologies related to obesity [22].

The down-regulation of proteins related to metabolic processes such as Amino Acid Metabolism, Carbohydrate Metabolism and Lipid Metabolism suggests a reduction of metabolic activity in the obese omental fat, and is consistent with previous mRNA studies [8–10, 23]; thus, Ortega et al. [10] demonstrated the down-regulation of the main lipogenic enzymes in obese omental fat using a large cohort of individuals. In this scenario, these findings provide evidence for an impaired capacity of the adipose tissue to function as an energy reservoir. In addition, it is noteworthy the high number of mitochondrial enzymes included in the set of down-regulated proteins in the obese adipose tissue, 14 proteins out of 24, which is consistent with the reduction in the oxidative metabolism in obesity. Our findings are in agreement with previous microarray analysis revealing a coordinated down-regulation of catabolic pathways operating in the mitochondria such as: fatty acid B

**A. Preadipocytes****B. Adipocytes****C. Adipocytes**

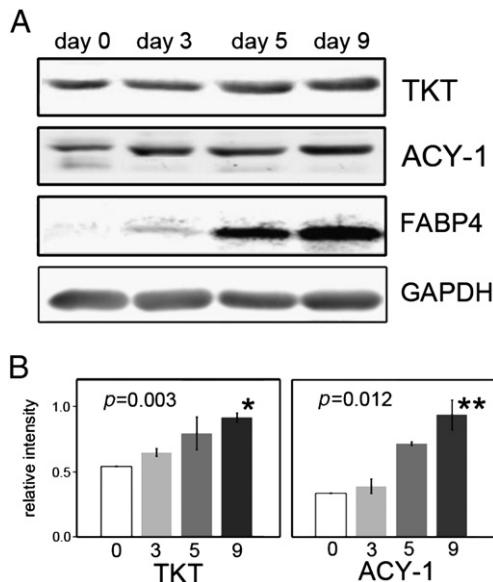
**Fig. 5 – Immunofluorescence staining of ACY-1 in human omental pre-adipocytes and adipocytes differentiated in vitro. ACY-1 (in red) is shown in the nucleus of pre-adipocytes (day 0) (A). In differentiated adipocytes (day 14) ACY-1 is observed in the cytosol and to a lesser extent in the nucleus (B). Close-up view of a differentiated adipocyte showing ACY-1 around the lipid droplets (C). The counterstaining of nuclei (DAPI) is shown in blue. Lipid droplets have been stained with BODIPY 493/503 (in green). Images are representative of three replicates.**

oxidation, tricarboxylic acid cycle and electron transport chain [24]. In addition, a strong correlation between impaired adipocyte mitochondrial activity and/or content and obesity has been well documented [25–27]. Decreased mitochondrial capacity in adipocytes may alter adipocyte insulin sensitivity and/or function due to the high energetic requirements for fatty acid storage, adipokine secretion [28], insulin signalling [29], and glucose uptake. Therefore, the relatively high number of mitochondrial proteins found down-regulated in our study is consistent with previous evidences.

The set of up-regulated proteins, which pertain to the following significantly enriched classes: *Cellular Process*, *Developmental Process*, *Cellular Component Organization*, and *Structural Molecule Activity*, suggests that the enlargement of the obese adipocytes, by increasing fat storage, is accompanied by: i) cytoskeleton changes, such as alteration of LMNA, LMNB1 and integrin alpha 7; ii) changes in the extracellular matrix (ECM), such as collagen (COL6A3) and lumican; and iii) tissue structure modifications, such as alteration in epithelial cytokeratins, CK-7, CK-8 and CK-19, compatible with omental

mesothelium changes. Our findings showing the up-regulation of proteins controlling cell architecture and tissue remodelling are in agreement with previous transcriptomic studies reporting that the expansion of adipose tissue is associated with a remodelling of ECM together with changes of fat cell cytoskeleton [23, 30] compatible with the need to adapt fat pads as adiposity increase.

Several relevant proteins highlighted by our study were more in-depth analyzed. Transketolase (TKT) expression levels were reduced in obese patients. To our knowledge this is the first time that a link between TKT and obesity is reported. This protein is a thiamine diphosphate (ThDP)-dependent enzyme that catalyzes several reactions in the non-oxidative branch of the Pentose Phosphate Pathway (PPP). In mammalian cells, the main function of PPP is to produce the reduced form of nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate (NADPH), which functions in detoxification processes and lipid biosynthesis. Another function of PPP is to convert hexose into pentose, which is required for nucleic acid synthesis [31]. TKT haploinsufficient mice showed a markedly reduction in



**Fig. 6 – TKT and ACY-1 and protein levels assessed by Western Blot during adipogenic maturation of 3T3-L1 (A). Values for relative intensity obtained after densitometry of the bands are means  $\pm$  SD. \*  $p < 0.005$  and \*\*  $p < 0.05$  for comparisons between TKT, and ACY-1 levels at day 9 vs. day 0, respectively (B). FABP4 was used as an adipogenesis control. The results were normalized for GAPDH density. Representative images of three independent analyses.**

adipose tissue (77%) [32] which could be induced by NADPH deficiency, limiting the production of lipids in the fat. The reduced levels of TKT found in the group of obese vs. non-obese subjects could be explained by the occurrence of a compensatory mechanism through which the obese adipose tissue would prevent further enlargement. In this scenario, during the period of dynamic obesity large amounts of NADPH are required for fatty acid biosynthesis, and an increase in TKT function is expected. In contrast, it is well known that lipogenic pathways are reduced in established obesity [10] and TKT down-regulation could be a late and adaptive process, aimed at limiting a further development of fat mass. Immunostaining methods showed for the first time the expression of TKT in human omental adipose tissue. TKT, an ubiquitous enzyme engaged in multiple metabolic pathways, was widely distributed in adipocytes as well as other stromal cells. TKT was present mainly in the cytoplasm of adipose cells, but a few nuclei also expressed the protein. Interestingly, the nuclei of human pre-adipocytes expressed TKT in contrast to fully differentiated adipocytes, in which TKT was only observed in the cytoplasm. A nuclear localization of TKT had already been described [33]; in this regard, it is interesting to mention that in a highly proliferative state increased cell division rate would require large amounts of phosphate pentose, which would account for the nuclear localization of TKT. On the other hand, mature adipocytes keep pentose phosphate consumption to a minimum while consuming many NADPH molecules for lipogenesis, which would explain TKT localization in the cytoplasm of mature adipocytes. Taken together, these findings highlight the potential role of this protein in adipose tissue and adipogenesis.

2D-DIGE and immunoblotting analyses have shown significant down-regulation of aminoacylase-1 (ACY-1) with obesity. ACY-1 is a cytosolic, homodimeric, zinc-binding enzyme that function in the catabolism and retrieval of acylated amino acids. ACY-1 expression has been found associated to renal carcinoma [34] and to an inborn metabolic disorder [35]. Nevertheless, this is the first report on ACY-1 expression in human fat. The nuclear localization of ACY-1 is striking. In agreement with our finding, this enzyme had been previously found in the nucleus of rat normal proximal tubular cells [34]. It is possible that several unidentified nuclear proteins are substrates for ACY-1. It is noteworthy that ACY-1 physically interacts and functionally modulates sphingosine kinase 1, SPHK1 [36], a lipid kinase that converts sphingosine and ATP to sphingosine-1-phosphate (S1P). S1P is a potent signalling molecule involved in angiogenesis and cell growth among other cellular processes [37]. Of note, we have shown that both ACY-1 and SPHK1 are associated with adipogenesis in 3T3-L1 cells (Fig. 6 and Supplemental Fig. 4) as already found with the latter [38]. These results collectively support the hypothesis that the SPHK1/ACY-1 system could play a role in obesity. Further studies are underway to explore ACY-1 functional role in adipose tissue.

Our results based on the 3T3-L1 adipocytes differentiation process have shown for the first time an increment of ACY-1 and TKT levels. Long-lasting fat excess has been evidenced to reduce adipogenesis in adipose tissue to limit further expansion of fat mass [8–11]. We hypothesize that the diminished levels of ACY-1 and TKT proteins in obesity stem from the impaired adipogenic capacity of obese adipocytes.

The proteomic analysis has enabled the identification of other relevant proteins involved in obesity or whose expression in fat has been widely documented. Results revealed the over-expression in obese subjects of HSP70. HSPs not only serve as chaperones, mainly controlling protein folding of newly translated polypeptides but also protect cells against many chronically and acutely stressful conditions [39]. In spite of the numerous cellular processes in which HSP70 takes part, it can be hypothesized that the higher levels of HSP70 found in the omental fat from obese patients would serve to reduce the cellular stress associated to obesity. In skeletal muscle, evidences have shown that there is a decreased expression of HSP70 in type 2 diabetes patients [40, 41] and in mice models an elevation of HSP70 protected against obesity-induced hyperglycemia, hyperinsulinemia, glucose intolerance and insulin resistance [41]. Nevertheless, no similar studies have been conducted in adipose tissue to date. We performed Western Blot analyses to compare omental fat samples from obese patients with and without type 2 diabetes. Interestingly, in agreement with these evidences, our results revealed that the amount of HSP70 was significantly lower in type 2 diabetes obese subjects than in obese without type 2 diabetes ( $p=0.007$ ), as illustrated in Supplemental Fig. 5. Therefore this result supports a protection role for HSP70.

It is well established that monoamine oxidase A (MAOA), a mitochondrial enzyme involved in the oxidative deamination catabolism of neurotransmitters and exogenous amines, is highly expressed in the adipocyte-enriched fraction of human adipose tissue [42]. Our results showed reduced levels of MAOA in obese subjects, which is in agreement with an earlier report revealing reduced MAOA activity in the adipose tissue from obese subjects [43]. Our study also showed reduced

expression levels of FABP5 in obese individuals, in consistency with previous studies in subcutaneous fat [44]. FABP5 is a relevant adipose tissue protein that facilitates lipid usage in metabolic pathways and plays a role in metabolic syndrome, insulin resistance, type 2 diabetes, and atherosclerosis, as elucidated in studies based on genetically modified mice [45]. Mice lacking FABP5 was protected against diet-induced obesity, insulin resistance and other related diseases [46]. Ongoing studies in our laboratory attempt to evaluate whether these results might be extrapolated to humans.

In summary, this work is, to our knowledge, the first proteomic study on omental fat comparing non-obese and obese people and represents one of the few proteomic analyses in human adipose tissue. Our findings evidence a clearly distinctive biological profile of obese and non-obese subjects highlighting a noticeably decreased expression of proteins related to metabolic processes and an increased expression of proteins that develop structural functions in the cell in response to obesity. Besides, our study has revealed that TKT and ACY-1 are promising new players involved in obesity. Our results will strengthen the understanding of molecular pathogenesis of obesity, whilst the identified proteins can be regarded as potential targets for future therapeutic strategies.

Supplementary materials related to this article can be found online at [doi:10.1016/j.jprot.2011.09.016](https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.09.016).

## Acknowledgements

This work was supported by Grants SAF-2009-10461 (to B.P.), SAF-2008-02073 (to J.M.F.R.) from the Ministerio de Ciencia e Innovación de España and from the Fundación Mutua Madrileña (to B.P.). The CNIC is supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación and the Pro CNIC Foundation. CIBER is an initiative from the Instituto de Salud Carlos III. We acknowledge the technical assistance of Ana de la Encarnación, Pablo Parra and Alba Moratalla.

## REFERENCES

- [1] Daniels SR, Jacobson MS, McCrindle BW, Eckel RH, Sanner BM. American Heart Association Childhood Obesity Research Summit Report. *Circulation* 2009;119:e489–517.
- [2] Calle EE, Kaaks R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2004;4:579–91.
- [3] Spiegelman BM, Flieger JS. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 2001;104:531–43.
- [4] Montague CT, O'Rahilly S. The perils of portliness: causes and consequences of visceral adiposity. *Diabetes* 2000;49:883–8.
- [5] Rebuffe-Scrive M, Andersson B, Olbe L, Björntorp P. Metabolism of adipose tissue in intraabdominal depots of nonobese men and women. *Metabolism* 1989;38:453–8.
- [6] Matsuzawa Y. Therapy insight: adipocytokines in metabolic syndrome and related cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006;3:35–42.
- [7] Keller MP, Attie AD. Physiological insights gained from gene expression analysis in obesity and diabetes. *Annu Rev Nutr* 2010;30:341–64.
- [8] Nadler ST, Stoehr JP, Schueler KL, Tanimoto G, Yandell BS, Attie AD. The expression of adipogenic genes is decreased in obesity and diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:11371–6.
- [9] Gomez-Ambrosi J, Catalan V, Diez-Caballero A, Martinez-Cruz LA, Gil MJ, Garcia-Foncillas J, et al. Gene expression profile of omental adipose tissue in human obesity. *FASEB J* 2004;18:215–7.
- [10] Ortega FJ, Mayas D, Moreno-Navarrete JM, Catalan V, Gomez-Ambrosi J, Esteve E, et al. The gene expression of the main lipogenic enzymes is downregulated in visceral adipose tissue of obese subjects. *Obesity (Silver Spring)* 2010;18:13–20.
- [11] Dubois SG, Heilbronn LK, Smith SR, Albu JB, Kelley DE, Ravussin E. Decreased expression of adipogenic genes in obese subjects with type 2 diabetes. *Obesity (Silver Spring)* 2006;14:1543–52.
- [12] Wang MY, Grayburn P, Chen S, Ravazzola M, Orci L, Unger RH. Adipogenic capacity and the susceptibility to type 2 diabetes and metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:6139–44.
- [13] Peral B, Camafeita E, Fernandez-Real JM, Lopez JA. Tackling the human adipose tissue proteome to gain insight into obesity and related pathologies. *Expert Rev Proteomics* 2009;6:353–61.
- [14] Perez-Perez R, Ortega-Delgado FJ, Garcia-Santos E, Lopez JA, Camafeita E, Ricart W, et al. Differential proteomics of omental and subcutaneous adipose tissue reflects their unalike biochemical and metabolic properties. *J Proteome Res* 2009;8:1682–93.
- [15] Peinado JR, Jimenez-Gomez Y, Pulido MR, Ortega-Bellido M, Diaz-Lopez C, Padillo FJ, et al. The stromal-vascular fraction of adipose tissue contributes to major differences between subcutaneous and visceral fat depots. *Proteomics* 2010;10:3356–66.
- [16] Khetepal I, Ku G, Coleman L, Yu G, Ptitsyn AA, Floyd ZE, et al. Proteome of human subcutaneous adipose tissue stromal vascular fraction cells versus mature adipocytes based on DIGE. *J Proteome Res* 2011;10:1519–27.
- [17] Corton M, Botella-Carrasco JI, Lopez JA, Camafeita E, San Millan JL, Escobar-Morreale HF, et al. Proteomic analysis of human omental adipose tissue in the polycystic ovary syndrome using two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Hum Reprod* 2008;23:651–61.
- [18] Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* 2006;1:2856–60.
- [19] Suckau D, Resemann A, Schuerenberg M, Hufnagel P, Franzen J, Holle A. A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Anal Bioanal Chem* 2003;376:952–65.
- [20] Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 1999;20:3551–67.
- [21] Ortega FJ, Vazquez-Martin A, Moreno-Navarrete JM, Bassols J, Rodriguez-Hermosa J, Girones J, et al. Thyroid hormone responsive Spot 14 increases during differentiation of human adipocytes and its expression is down-regulated in obese subjects. *Int J Obes (Lond)* 2010;34:487–99.
- [22] Despres JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 2006;444:881–7.
- [23] Henegar C, Tordjman J, Achard V, Lacasa D, Cremer I, Guerre-Millo M, et al. Adipose tissue transcriptomic signature highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity. *Genome Biol* 2008;9:R14.
- [24] Marrades MP, Gonzalez-Muniesa P, Arteta D, Martinez JA, Moreno-Aliaga MJ. Orchestrated downregulation of genes involved in oxidative metabolic pathways in obese vs. lean high-fat young male consumers. *J Physiol Biochem* 2011;67:15–26.
- [25] Wilson-Fritch L, Burkhardt A, Bell G, Mendelson K, Leszyk J, Nicoloro S, et al. Mitochondrial biogenesis and remodeling

- during adipogenesis and in response to the insulin sensitizer rosiglitazone. *Mol Cell Biol* 2003;23:1085–94.
- [26] Rong JX, Qiu Y, Hansen MK, Zhu L, Zhang V, Xie M, et al. Adipose mitochondrial biogenesis is suppressed in db/db and high-fat diet-fed mice and improved by rosiglitazone. *Diabetes* 2007;56:1751–60.
- [27] Patti ME, Corvera S. The role of mitochondria in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 2010;31:364–95.
- [28] Koh EH, Park JY, Park HS, Jeon MJ, Ryu JW, Kim M, et al. Essential role of mitochondrial function in adiponectin synthesis in adipocytes. *Diabetes* 2007;56:2973–81.
- [29] Shi X, Burkart A, Nicoloro SM, Czech MP, Straubhaar J, Corvera S. Paradoxical effect of mitochondrial respiratory chain impairment on insulin signaling and glucose transport in adipose cells. *J Biol Chem* 2008;283:30658–67.
- [30] Poussin C, Hall D, Minehira K, Galzin AM, Tarussio D, Thorens B. Different transcriptional control of metabolism and extracellular matrix in visceral and subcutaneous fat of obese and rimonabant treated mice. *PLoS One* 2008;3:e3385.
- [31] Schenk G, Duggley RG, Nixon PF. Properties and functions of the thiamin diphosphate dependent enzyme transketolase. *Int J Biochem Cell Biol* 1998;30:1297–318.
- [32] Xu ZP, Wawrousek EF, Piatigorsky J. Transketolase haploinsufficiency reduces adipose tissue and female fertility in mice. *Mol Cell Biol* 2002;22:6142–7.
- [33] Joshi S, Singh AR, Kumar A, Misra PC, Siddiqi MI, Saxena JK. Molecular cloning and characterization of Plasmodium falciparum transketolase. *Mol Biochem Parasitol* 2008;160:32–41.
- [34] Zhong Y, Onuki J, Yamasaki T, Ogawa O, Akatsuka S, Toyokuni S. Genome-wide analysis identifies a tumor suppressor role for aminoacylase 1 in iron-induced rat renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2009;30:158–64.
- [35] Sass JO, Mohr V, Olbrich H, Engelke U, Horvath J, Fliegauf M, et al. Mutations in ACY1, the gene encoding aminoacylase 1, cause a novel inborn error of metabolism. *Am J Hum Genet* 2006;78:401–9.
- [36] Maceyka M, Nava VE, Milstien S, Spiegel S. Aminoacylase 1 is a sphingosine kinase 1-interacting protein. *FEBS Lett* 2004;568:30–4.
- [37] Allende ML, Yamashita T, Proia RL. G-protein-coupled receptor S1P1 acts within endothelial cells to regulate vascular maturation. *Blood* 2003;102:3665–7.
- [38] Hashimoto T, Igarashi J, Kosaka H. Sphingosine kinase is induced in mouse 3T3-L1 cells and promotes adipogenesis. *J Lipid Res* 2009;50:602–10.
- [39] Calderwood SK, Khaleque MA, Sawyer DB, Ciocca DR. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci* 2006;31:164–72.
- [40] Kurucz I, Morva A, Vaag A, Eriksson KF, Huang X, Groop L, et al. Decreased expression of heat shock protein 72 in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes correlates with insulin resistance. *Diabetes* 2002;51:1102–9.
- [41] Chung J, Nguyen AK, Henstridge DC, Holmes AG, Chan MH, Mesa JL, et al. HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:1739–44.
- [42] Pizzinat N, Marti L, Remaury A, Leger F, Langin D, Lafontan M, et al. High expression of monoamine oxidases in human white adipose tissue: evidence for their involvement in noradrenaline clearance. *Biochem Pharmacol* 1999;58:1735–42.
- [43] Visentin V, Prevot D, De Saint Front VD, Morin-Cussac N, Thalamas C, Galitzky J, et al. Alteration of amine oxidase activity in the adipose tissue of obese subjects. *Obes Res* 2004;12:547–55.
- [44] Fisher RM, Hoffstedt J, Hotamisligil GS, Thorne A, Ryden M. Effects of obesity and weight loss on the expression of proteins involved in fatty acid metabolism in human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002;26:1379–85.
- [45] Furuhashi M, Hotamisligil GS. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7:489–503.
- [46] Maeda K, Cao H, Kono K, Gorgun CZ, Furuhashi M, Uysal KT, et al. Adipocyte/macrophage fatty acid binding proteins control integrated metabolic responses in obesity and diabetes. *Cell Metab* 2005;1:107–19.

# Uncovering Suitable Reference Proteins for Expression Studies in Human Adipose Tissue with Relevance to Obesity

Rafael Pérez-Pérez<sup>1,2</sup>, Juan A. López<sup>3</sup>, Eva García-Santos<sup>1,2</sup>, Emilio Camafeita<sup>3</sup>, María Gómez-Serrano<sup>1,2</sup>, Francisco J. Ortega-Delgado<sup>4,2</sup>, Wifredo Ricart<sup>4,2</sup>, José M. Fernández-Real<sup>4,2</sup>, Belén Peral<sup>1,2\*</sup>

**1** Instituto de Investigaciones Biomédicas, Alberto Sols, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) & Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Madrid, Spain,

**2** CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERobn), ISCIII, Madrid, Spain, **3** Unidad de Proteómica, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), Madrid, Spain, **4** Department of Diabetes, Endocrinology and Nutrition, Hospital Dr. Josep Trueta, Girona, Spain

## Abstract

**Background:** Protein expression studies based on the two major intra-abdominal human fat depots, the subcutaneous and the omental fat, can shed light into the mechanisms involved in obesity and its co-morbidities. Here we address, for the first time, the identification and validation of reference proteins for data standardization, which are essential for accurate comparison of protein levels in expression studies based on fat from obese and non-obese individuals.

**Methodology and Findings:** To uncover adipose tissue proteins equally expressed either in omental and subcutaneous fat depots (study 1) or in omental fat from non-obese and obese individuals (study 2), we have reanalyzed our previously published data based on two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis. Twenty-four proteins (12 in study 1 and 12 in study 2) with similar expression levels in all conditions tested were selected and identified by mass spectrometry. Immunoblotting analysis was used to confirm in adipose tissue the expression pattern of the potential reference proteins and three proteins were validated: PARK7, ENOA and FAA. Western Blot analysis was also used to test customary loading control proteins. ENOA, PARK7 and the customary loading control protein Beta-actin showed steady expression profiles in fat from non-obese and obese individuals, whilst FAA maintained steady expression levels across paired omental and subcutaneous fat samples.

**Conclusions:** ENOA, PARK7 and Beta-actin are proper reference standards in obesity studies based on omental fat, whilst FAA is the best loading control for the comparative analysis of omental and subcutaneous adipose tissues either in obese and non-obese subjects. Neither customary loading control proteins GAPDH and TBB5 nor CALX are adequate standards in differential expression studies on adipose tissue. The use of the proposed reference proteins will facilitate the adequate analysis of proteins differentially expressed in the context of obesity, an aim difficult to achieve before this study.

**Citation:** Pérez-Pérez R, López JA, García-Santos E, Camafeita E, Gómez-Serrano M, et al. (2012) Uncovering Suitable Reference Proteins for Expression Studies in Human Adipose Tissue with Relevance to Obesity. PLoS ONE 7(1): e30326. doi:10.1371/journal.pone.0030326

**Editor:** Massimo Federici, University of Tor Vergata, Italy

**Received** October 12, 2011; **Accepted** December 19, 2011; **Published** January 17, 2012

**Copyright:** © 2012 Pérez-Pérez et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by Grants SAF-2009-10461 and SAF-2008-02073 from the MICINN, and from the Fundación Mutua Madrileña, Spain (BP). The CNIC is supported by MICINN and Pro CNIC Foundation. CIBERobn is an initiative from the Instituto de Salud Carlos III. The funders had no role in study design, data collection nor analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: bperal@iib.uam.es

## Introduction

Quantitative proteomic and genomic technologies have recently revolutionized the search for disease-specific biomarkers or molecular signatures, enabling a better understanding of molecular events associated with disease development and progression, and eventually proposing therapeutic targets. At the protein expression level, confirmation of differences detected by proteomics is usually carried out by complementary approaches like immunoblotting analysis. Although classical Western Blot is typically used for qualitative purposes, quantification and accurate comparison of protein levels is feasible by the inclusion of reference standard proteins to better assess biological and experimental variations.

Ideally, a “good” internal reference control is expected to show constant expression levels across samples within a given experi-

mental design. There is mounting evidence that housekeeping proteins used as ubiquitous loading controls, such as glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), Beta-actin and tubulin beta chain (TBB5) often show varying expression levels across samples and experimental conditions [1,2,3]. Since these proteins are also used in human adipose tissue expression studies, there are unmet needs to validate and/or identify a set of stable reference proteins for data standardization in this tissue.

Adipose tissue, previously seen as an inert fat depot, is now recognized as a highly active organ with many important physiological and pathological roles. This endocrine organ cross-talks with other essential organs acting as a crucial regulator of whole-body homeostasis [4,5]. Human adipose tissue comprises two major intra-abdominal depots, the subcutaneous and the omental fat depot. A number of epidemiologic studies have shown



that the size of the omental, more than the subcutaneous, fat is closely associated with a higher risk of obesity-related comorbidities, such as insulin resistance, type 2 diabetes and cardiovascular disease [5,6]. However, the underlying mechanisms for this association are not yet clear. Neither are the molecular mechanisms that lead to and take part in the development of obesity and the pathologies associated to obesity well understood.

Expression studies in adipose tissue are pivotal to gain insight into the mechanisms involved in obesity and its co-morbidities, and ultimately find novel markers and therapeutic targets. Recently a number of genomic and proteomic studies have revealed potential genes and proteins involved in obesity and/or type 2 diabetes [7,8,9], as well as differentially expressed genes and proteins in the omental and subcutaneous fat comparisons [10,11,12,13,14,15]. Most studies resort to real time-PCR and Western Blot to validate these genes and proteins, respectively; however, despite that several genes have been proposed as suitable endogenous controls in gene expression studies on adipose tissue [16,17,18] no studies have attempted the identification and validation of adequate protein reference standards. As a consequence, expression studies continue to rely on customary loading controls (GAPDH, Beta-actin, TBB5) with unproven performance, which could overshadow the study conclusions owing to misinterpretation of results.

In the quest for reliable protein markers (i.e. showing steady expression) in human adipose tissue we have reanalyzed previously data from two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis (2D-DIGE) [10] and [19] for later protein identification by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS) and Western Blot. Moreover we have studied, for the first time to our knowledge, reference standards frequently used in protein expression studies related to obesity research to find out their suitability as loading controls in immunoblotting analysis in human adipose tissue.

## Methods

### Ethics Statement

This study has been conducted according to the recommendations of the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committees of Hospital Dr. Josep Trueta (Girona, Spain). Signed informed consent was obtained from all subjects.

### Biological samples

Omental and subcutaneous adipose tissue samples used in 2D-DIGE analysis had been previously described [10] and [19]. Additional samples of omental and subcutaneous adipose tissue were obtained from 20 men and 30 women, who had been submitted for elective surgical procedures (cholecystectomy, surgery of abdominal hernia and gastric by-pass surgery). Clinical and biochemical characteristics of these 50 subjects are described in Table S1. Non-obese subjects had a body mass index (BMI)<30 kg/m<sup>2</sup> and obese subjects had a BMI>30 kg/m<sup>2</sup>. During surgery, biopsies of adipose tissues were obtained after an overnight fast, washed in chilled 9 g/L NaCl solution, partitioned into pieces, and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until protein extraction. The surgeon aimed to obtain the samples from similar anatomical locations in all the subjects. All subjects were of Caucasian origin and reported that their body weight had been stable for at least three months before the study. None of the subjects had type 2 diabetes or any other systemic disease apart from obesity and all were free of any infections within the previous month before the study. Liver disease and thyroid dysfunction were specifically excluded by biochemical work-up.

Other exclusion criteria for those patients included the following: 1) clinically significant hepatic, neurological, or other major systemic disease, including malignancy; 2) history of drug or alcohol abuse, defined as >80 g/day, or serum transaminase activity more than twice the upper normal range limit; 3) elevated serum creatinine concentrations; 4) acute major cardiovascular event in the previous 6 months; 5) acute illnesses and current evidence of chronic inflammatory or infectious diseases; and 6) mental illness rendering the subjects unable to understand the nature, scope, and possible consequences of the analysis.

### 2D-DIGE separation and analysis

Protein extract preparation and separation by 2D-DIGE have been independently described for study 1, which compared omental and subcutaneous fat depots from obese individuals [10] and for study 2, which compared omental adipose tissue from non-obese and obese individuals [19]. Briefly, proteins were extracted from adipose tissue biopsies and the concentration was determined using the RC/DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Protein extracts were labelled with Cy2, Cy3 or Cy5 fluorescent cyanine dyes, and were mixed and separated on 2-DE gels using 24 cm pH 3–11 NL strips in the first dimension and 12% SDS-PAGE gels in the second dimension. After SDS-PAGE, gels were scanned with a Typhoon 9400 fluorescent scanner (GE Healthcare) at 100 μm resolution using appropriate individual excitation and emission wavelengths and filters. Gel images previously analyzed with the DeCyder software (GE Healthcare) to detect the corresponding proteins differentially expressed in either study 1 [10] and study 2 [19] were now reanalyzed with DeCyder software v7 to reveal protein spots which remained significantly unaffected (i.e. with average ratio around 1) across samples in each study.

### In-gel trypsin digestion and mass spectrometry

Protein spots which remained significantly unaffected across samples as revealed by DeCyder software were selected for gel excision from silver-stained gels, digested automatically and analyzed in an Ultraflex MALDI TOF/TOF mass spectrometer (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) [20] to obtain the corresponding MALDI-MS and MALDI-MS/MS spectra. In a first step, MALDI-MS spectra were acquired by averaging 300 individual spectra in the positive ion reflector mode at 50 Hz laser frequency in a mass range from 800 to 4000 Da. In a second step, precursor ions showing in the MALDI-MS mass spectrum were subjected to fragment ion analysis in the tandem (MS/MS) mode to average 1000 spectra. Peak labeling, internal calibration based on two trypsin autolysis ions with m/z = 842.510 and m/z = 2211.105, as well as removal of known trypsin and keratin peptide masses were performed automatically using the flexAnalysis 2.2 software (Bruker Daltonik). No smoothing or any further spectral processing was applied. MALDI-MS and MS/MS spectra were manually inspected in detail and reacquired, recalibrated and/or relabeled using the aforementioned programs and homemade software when necessary.

### Database searching

MALDI-MS and MS/MS data were combined through the BioTools 3.0 program (Bruker Daltonik) to search a nonredundant protein database (NCBI nr 20091022; ~7.0×10<sup>6</sup> entries; National Centre for Biotechnology Information, Bethesda, US), using the Mascot 2.2 software (Matrix Science, London, UK; <http://www.matrixscience.com>) [21]. Other relevant search parameters were set as follows: enzyme, trypsin; fixed modifications, carbamidomethyl (C); allow up to 1 missed cleavage; peptide tolerance

$\pm 20$  ppm; MS/MS tolerance  $\pm 0.5$  Da. Protein scores greater than 81 were considered significant ( $p < 0.05$ ).

### Immunoblotting analysis

Fat tissue was homogenized in radioimmuno precipitation assay (RIPA) buffer as described in [10]. Protein extracts (10 µg) were loaded, resolved on 10–14% SDS-PAGE and transferred to Hybond ECL nitrocellulose membranes by conventional procedures. Membranes were stained with 0.15% Ponceau red (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) to ensure equal loading after transfer and then blocked with 5% (w/v) BSA or dried nonfat milk in TBS buffer with 0.1% Tween 20. The antibodies used for Western Blot analysis revealed in each case single bands at the expected molecular masses. The primary antibodies used were 1:10000 rabbit anti-ENO (sc-15343), 1:200 goat anti-PARK7 (sc-27004), 1:1000 goat anti-FAA (sc-66223), 1:2000 goat anti-Beta-actin (sc-1616), 1:500 goat anti-PGK1 (sc-17943), 1:5000 mouse anti-TBB5 (sc-134234), and 1:5000 rabbit anti-CALX (sc-11397) all from Santa Cruz Biotechnology, Inc (Heidelberg, Germany) and 1:4000 mouse anti-GAPDH, AM4300 (Ambion, Austin, USA). Blots were incubated with the appropriate IgG-HRP-conjugated secondary antibody. Immunoreactive bands were visualized with ECL-plus reagent kit (GE Healthcare). Blots were exposed for different times; exposures in the linear range of signal were selected for densitometric evaluation. Optical densities of the immunoreactive bands were measured using Image J analysis software.

### Immunohistochemistry

Five-micron sections of formalin-fixed paraffin-embedded adipose tissue were deparaffinized and rehydrated prior to antigen unmasking by boiling in 1 mM EDTA, pH 8. Sections were blocked in normal serum and incubated overnight with the following antibodies: rabbit anti-ENO (sc-15343) at 1:100 dilution, goat anti-PARK7 (sc-27004) at 1:50 dilution, and goat anti-FAA (sc-66223) at 1:50 dilution. Secondary antibody staining was performed using the VECTASTAIN ABC kit (Vector laboratories, Inc Burlingame, CA) and detected with diaminobenzidine (DAB, Vector Laboratories, Inc). Sections were counterstained with hematoxylin prior to dehydration and coverslip placement. As a negative control, the entire immunohistochemical procedure was performed on adjacent sections in the absence of primary antibody.

### Statistical analyses

Descriptive results of continuous variables are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Before statistical analysis, normal distribution and homogeneity of the variances were evaluated using Levene's test. One-way ANOVA, for multiple comparisons, using post-hoc by Bonferroni's test (when equal variances could be assumed), was used to compare groups. The statistical analyses were performed using the program SPSS 16.0 (SPSS Inc., Illinois, USA). Statistical comparisons of the Western Blot densitometry data were carried out using the Student's *t* test for paired (omental *vs.* subcutaneous) and independent (obese *vs.* non-obese) samples, and results were expressed as means  $\pm$  SD using SPSS. The coefficient of variation (CV) was also calculated. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

## Results

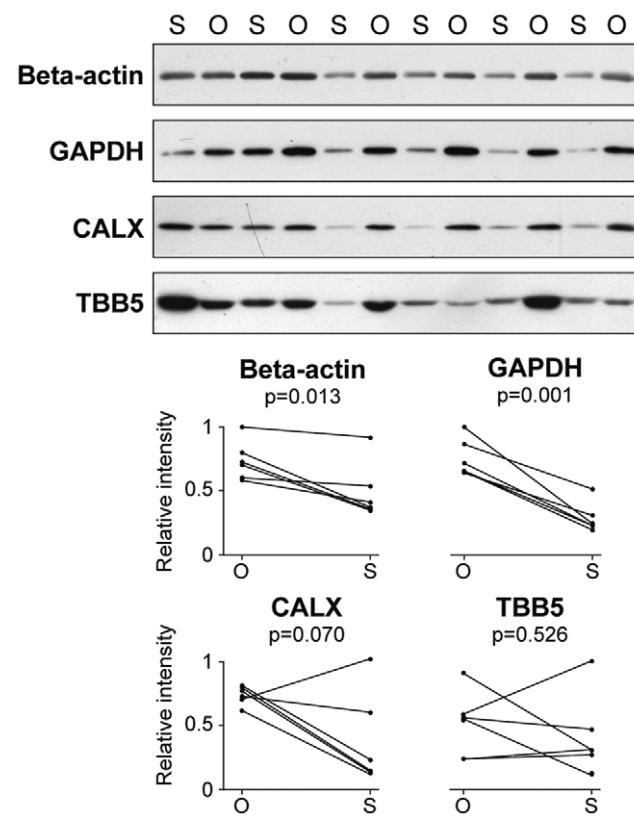
### Reference proteins for comparative expression studies between omental and subcutaneous adipose tissue

We had previously found over-expression of GAPDH in the omental compared to the subcutaneous human adipose tissue [10].

Given that this protein is a customary loading control in expression studies, we evaluated other common reference proteins, namely Beta-actin and TBB5, as well as calnexin (CALX) in omental and subcutaneous adipose tissue by Western Blot. We have tested samples from 50 patients, including males and females across a wide BMI range and a wide age range, as described in Table S1. Beta-actin and CALX levels were higher in the omental than in the subcutaneous fat ( $p < 0.05$ ), as was the case for GAPDH, while TBB5 showed a very heterogeneous expression profile across samples (coefficient of variation, CV = 59%). Figure 1 shows a representative group of samples to illustrate the expression pattern of these proteins. Results demonstrate that neither customary Beta-actin, TBB5 and GAPDH nor CALX are adequate reference standards for protein expression studies addressing the comparison of omental and subcutaneous samples.

In view of the lack of suitable standard proteins, a reanalysis was accomplished with data from our previously published proteomic study based on 2D-DIGE and MALDI-MS analyses [10] to uncover appropriate reference standards. Twelve spots with similar expression levels across samples were selected and identified by MALDI-MS (Table 1 and Figure 2A).

Based on 2D-DIGE results, a set of three least-variable proteins, namely enolase 1 (ENO), phosphoglycerate kinase 1 (PGK1) and fumarylacetoacetate (FAA), were evaluated by Western Blot in fat tissue samples from the subjects included in the study. Figure 2B shows expression levels of these three proteins in a representative group of samples. Results demonstrate that FAA maintained



**Figure 1. Protein expression levels in human omental and subcutaneous adipose tissue.** Representative Western Blot analysis of Beta-actin, GAPDH, CALX and TBB5 in omental (O) and subcutaneous (S) fat samples. Paired relative intensity values from band densitometry in omental and subcutaneous fat samples from the same individual are represented.  
doi:10.1371/journal.pone.0030326.g001

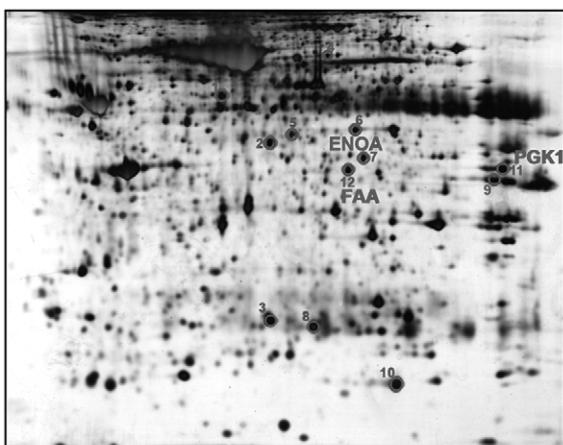
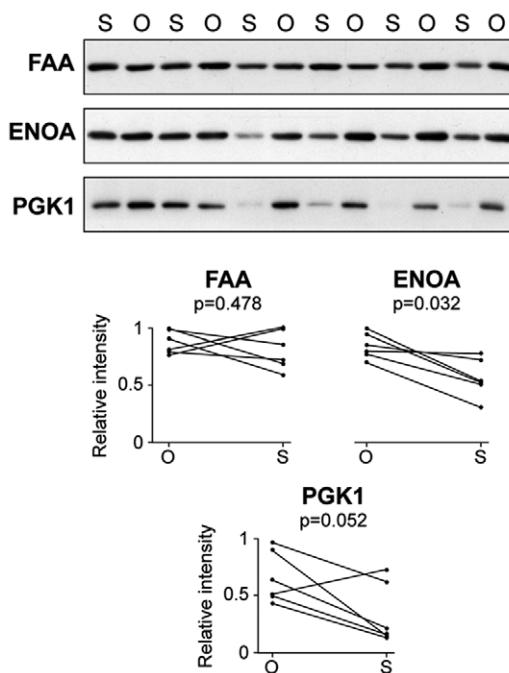
**Table 1.** Candidate reference proteins identified by MALDI-MS study.

Spot <sup>a</sup>	Accession Code NCBI	Accession Code Swiss-Prot	Protein Description	Mascot Score	Mascot Expect	Mascot Ions score	MW (kDa)	pI	Matched/Unmatched peptides	Coverage
Omental vs. subcutaneous										
1	gi 1195959640	PDIA3_HUMAN	Protein disulfide isomerase family A, member 3, isoform CRA_a	278	1.30E-21	95	54.4	6.78	13/3	31
2	gi 18379349	VAT1_HUMAN	Vesicle amine transport protein 1	220	8.00E-16	88	42.1	5.88	7/1	27
3	gi 1922287	ECHS1_HUMAN	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	234	3.20E-17	103	31.8	8.34	8/2	26
4	gi 3420181	WDR1_HUMAN	WDR1 protein	106	0.0002	74	58.6	6.41	2/0	4
5	gi 169646441	GD12_HUMAN	GDP dissociation inhibitor 2 isoform 2	184	3.20E-12	80	46.0	5.91	7/1	25
6	gi 39644728	ENO4_HUMAN	Enolase 1	143	4.60E-08	80	29.2	5.87	6/1	19
7	gi 3641398	IDH1_HUMAN	NADP-dependent isocitrate dehydrogenase	214	3.20E-15	75	46.9	6.34	10/2	23
8	gi 4758638	PRDX6_HUMAN	Peroxiredoxin 6	191	6.30E-13	—	25.1	6	10/1	39
9	gi 119587507	THIL_HUMAN	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	96	0.002	74	21.6	9.28	1/0	6
10	gi 4503057	CRYAB_HUMAN	Crystallin, alpha B	134	3.20E-07	89	20.1	6.76	7/1	22
11	gi 4505763	PGK1_HUMAN	Phosphoglycerate kinase 1	194	8.90E-15	120	45.0	8.3	5/0	18
12	gi 4557587	FAA_HUMAN	Fumarylacetoacetate	98	0.0018	79	46.7	6.46	2/0	3
Obese vs. non-obese										
13	gi 203282367	ENO4_HUMAN	Enolase 1	298	1.60E-23	—	47.3	6.99	19/3	45
14	gi 5453597	CAZA1_HUMAN	F-actin capping protein alpha-1 subunit	203	5.00E-14	103	33.1	5.45	5/1	29
15	gi 4504981	LEG1_HUMAN	Galectin-1	212	1.40E-16	155	15.0	5.34	3/0	29
16	gi 6598323	GDB_HUMAN	GDP dissociation inhibitor 2 isoform 1	410	9.90E-35	135	51.1	6.11	18/4	45
17	gi 4557587	FAA_HUMAN	Fumarylacetoacetate	177	2.00E-11	85	46.7	6.46	6/1	14
18	gi 9951915	SAHH_HUMAN	Adenosylhomocysteinase isoform 1	183	5.00E-12	90	48.2	5.92	5/1	14
19	gi 4503481	EF1G_HUMAN	Eukaryotic translation elongation factor 1 gamma	363	5.00E-30	165	50.4	6.25	16/2	37
20	gi 25777615	PSD7_HUMAN	Proteasome 26S non-ATPase subunit 7	145	7.10E-10	59	37.1	6.29	4/1	21
21	gi 31543380	PARK7_HUMAN	Parkinson disease protein 7	241	1.80E-19	139	20.0	6.33	5/2	26
22	gi 5803187	TALDO_HUMAN	Transaldolase 1	104	8.90E-06	48	37.7	6.36	3/1	10
23	gi 11961909	PGK1_HUMAN	Phosphoglycerate kinase 1, isoform CRA_b	291	7.40E-23	194	28.0	9.23	5/2	23
24	gi 4503571	ENO4_HUMAN	Enolase 1	182	6.30E-12	—	47.5	7.01	10/2	32

Protein spots with similar expression levels across samples were identified by MALDI-MS after comparative analyses of omental vs. subcutaneous adipose tissue (spots from 1 to 12) and omental fat from obese vs. non-obese subjects (spots from 13 to 24).

<sup>a</sup>Spot numbering as in Figure 2A (1–12) and Figure 4A (13–24).  
doi:10.1371/journal.pone.0030326.t001



**A****B**

**Figure 2. Proteins identified by 2D-DIGE and MS showing sustained expression levels in omental and subcutaneous adipose tissues.** Protein extracts from subcutaneous and omental adipose tissue paired samples were analyzed by 2D-DIGE [10]. Proteins were revealed by AgNO<sub>3</sub> staining and based on DeCyder analysis the spots of interest were excised from the gel and subject to MS-based identification. A representative silver-stained gel is shown; the numbers correspond to 12 selected protein spots as indicated in Table 1 (A). Representative Western Blot analysis of selected proteins in omental (O) and subcutaneous (S) fat samples. Paired relative intensity values from band densitometry in fat samples from the same individual are represented (B).

doi:10.1371/journal.pone.0030326.g002

steady expression levels across paired omental and subcutaneous fat samples, with a CV of 16%, ENOA was over-expressed in the omental fat biopsies compared to subcutaneous fat, and PGK1 showed variable expression levels across the majority of paired samples, presenting a CV of 59% (Figure 2B). Consequently, FAA was the most suitable loading control for studying differential expression between omental and subcutaneous adipose tissue.

#### Reference proteins for comparative expression studies in omental adipose tissue from obese and non-obese individuals

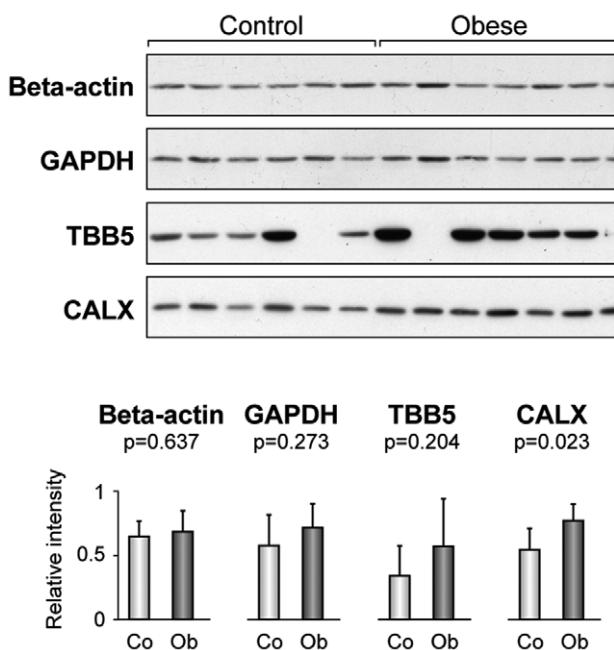
The expression patterns of GAPDH, Beta-actin, TBB5 and CALX were evaluated by immunoblotting analysis, using omental fat protein extracts from non-obese and obese patients. Expression levels of GAPDH, TBB5 and CALX were higher in obese patients. GAPDH and TBB5 showed considerable intra-group variation, especially TBB5 with CV = 70% (Figure 3). Accordingly, these proteins do not constitute appropriate loading controls in comparative protein expression studies comprising non-obese and obese individuals. On the contrary, results unveiled that Beta-actin was an appropriate reference standard, albeit the moderate intra-group variation observed for this protein (CV = 21%).

To uncover alternative suitable reference proteins, a reanalysis was accomplished with data from our previous proteomic study comparing omental fat biopsies from six obese and six non-obese subjects based on 2D-DIGE [19]. Twelve protein spots with steady levels across samples were selected and excised from silver-stained gels, digested with trypsin, and analyzed by MALDI-MS (Table 1 and Figure 4A), including ENOA, FAA and Parkinson disease protein 7 (PARK7), which showed the least variability across

samples according to DeCyder software. This is illustrated in Figure 4B, where representative zoomed images of 2D-DIGE gels around PARK7 spot demonstrate sustained levels of this protein, with a fold change ratio between the two sample groups of 1.07.

These three proteins were further evaluated by Western Blot using omental samples from non-obese and obese subjects. This study revealed nearly invariable ENOA and PARK7 levels in obese and non-obese individuals, together with a highly homogeneous intra-group expression pattern across samples (SD 0.11 and 0.13 for non-obese and obese samples, respectively, with ENOA; SD 0.2 and 0.14 with PARK7). CV values were 16% for ENOA and 22% for PARK7, the latter being similar to the CV value of Beta-actin. FAA exhibited slightly heterogeneous expression patterns across samples, with a CV of 35% (Figure 4C). Therefore, our studies unveiled that ENOA, PARK7 and Beta-actin can be considered adequate reference proteins for expression studies in human omental adipose tissue in non-obese and obese subjects.

To extend the validity of the proposed protein markers to tissues from obese type 2 diabetic patients, the expression levels of ENOA, PARK7, FAA, Beta-actin, GAPDH, TBB5 and CALX levels were compared by immunoblotting analysis. We used omental adipose tissue proteins from non-obese and non-diabetic subjects *vs.* obese and type 2 diabetic patients. Type 2 diabetes was diagnosed when fasting serum glucose was above 126 mg/dl or serum glucose 2 hour after oral glucose tolerance test was above 200 mg/dl, repeated at least 2 times. ENOA and PARK7 showed the most steady expression profiles across samples with CV of 13% and 20%, respectively, therefore revealing as the most appropriate reference standards when comparing non-diabetic and type 2 diabetic subjects (Figure S1).



**Figure 3. Protein expression levels in omental adipose tissue from non-obese and obese subjects.** Representative Western Blot analysis of Beta-actin, GAPDH, TBB5 and CALX expression in omental fat samples from non-obese (control) and obese subjects. Relative intensity values from band densitometry are expressed as mean  $\pm$  SD.  
doi:10.1371/journal.pone.0030326.g003

## Discussion

Reference standards with steady expression across tissue sample cohorts are indispensable in clinical research to reliably determine altered proteins associated to human disease. We have successfully identified and validated proteins with sustained expression levels to be used as reference standards in expression studies on human adipose tissue with relevance to the pathophysiology of obesity. An objective of many differential expression studies is to define protein profiles that can distinguish between normal and pathological states, enabling a better understanding of molecular events associated with disease development and progression, and eventually proposing novel biomarkers or therapeutic targets. Confirmation of differences at the protein expression level is usually carried out by immunoblotting analysis, which becomes quantitative by using loading controls. Nevertheless, these quantitative measurements are prone to error due to overloading of internal standards and over-reliance on normalization [1,3]. With the antibodies and experimental conditions used in this study, 10  $\mu$ g of proteins have enabled linearity in Western Blot analysis. This emphasizes the need to optimize experimental conditions for a given assay, including avoidance of blot overexposure to ensure a linear relation between protein concentration and Western Blot signal.

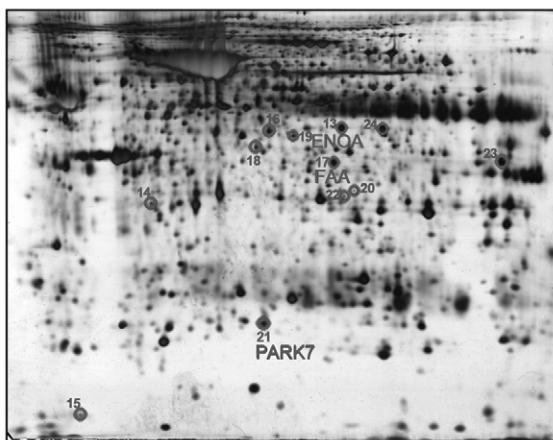
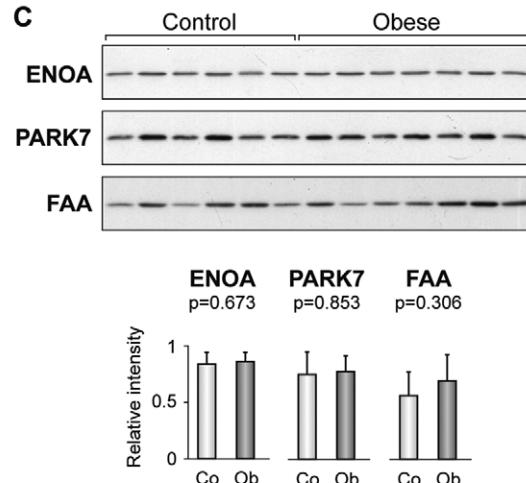
Most reference controls consist of housekeeping genes and proteins, as these are constitutively expressed for functions required for cell maintenance. However, lately many gene expression studies, a few of them based on adipose tissue, have shown that several of the commonly used housekeeping genes may be unsuitable due to the influence of physiological and pathological events on their expression [17,18]. Although a few protein studies have addressed this point [2,22], no systematic work has evaluated customary reference proteins in adipose tissue, and therefore expression analyses continue to rely on Beta-actin,

TBB5, GAPDH and/or CALX [23,24,25,26,27,28,29]. It is noteworthy that constitutive expression in cells does not preclude regulation; in fact our results show that most proteins currently used as loading controls cannot be regarded suitable reference standards in human adipose tissue. While Beta-actin is the only customary reliable reference when comparing omental fat from obese and non-obese subjects, it is utterly inadequate for the comparison of omental and subcutaneous fat. As a consequence, housekeeping proteins to be used as reference standards should be carefully assayed.

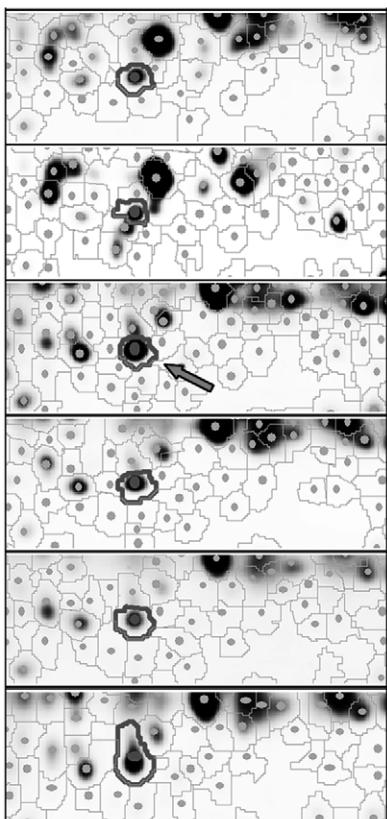
Consequently, we resorted for the first time to 2D-DIGE, MS and immunoblotting analyses to identify adipose tissue reference proteins equally expressed in the two major intra-abdominal fat depots, the omental and the subcutaneous depots, across a wide adiposity range. In addition, since omental adipose tissue has been linked to many of the morbidities associated with obesity, including type 2 diabetes and cardiovascular disease [5,6], we have searched for reference proteins by comparing omental fat biopsies from obese and non-obese subjects. In fact, it has been speculated whether omental fat would be a causal factor, or a marker of “dysfunctional adipose tissue” [30].

Our study has revealed a trend to increased protein levels in the omental versus subcutaneous fat (Figure 1 and Figure 2B). Mesothelium tissue, which is present only in the omental fat [31], could in some instances account for these increased levels, as is the case for ENOA, which is also expressed in the mesothelial cells (Figure 5). Nevertheless, ENOA expression remained steady in the omental fat from non-obese and obese individuals. It is not surprising that this highly conserved, multifunctional enzyme involved in a variety of cellular biological processes such as growth control, may exert similar functions regardless of obesity and/or type 2 diabetes states. Likewise, PARK7 showed stable expression levels in non-obese and obese adipose tissue. The product of the gene *DJ-1* is a highly conserved protein implicated in a number of cell processes. First identified as an oncogene driving to abnormal cellular responses related to cell survival [32], *DJ-1* is also recognized as one of the defective genes in Parkinson disease, due to loss-of-function mutations [33]. Although PARK7 has been found modulated in several pathological conditions, such as endometriosis and hepatocellular carcinoma [34,35,36], our results, supported by two techniques, show that PARK7 is not differentially expressed in obesity. As far as we know, this protein had not been studied in human adipose tissue yet. Our findings based on immunohistochemical analyses have shown for the first time expression of PARK7 in adipocytes, mesothelial cells and other stromal cells in omental adipose tissue, supporting its ubiquitous expression [37]. PARK7 antibody stained mainly the nucleus of cells, but cytoplasm expression was also observed (Figure 5). It is noteworthy that the optional use of PARK7 or ENOA (19.9 and 47.2 kDa, respectively) enables quantitative Western Blot analysis in a wide range of protein molecular weight.

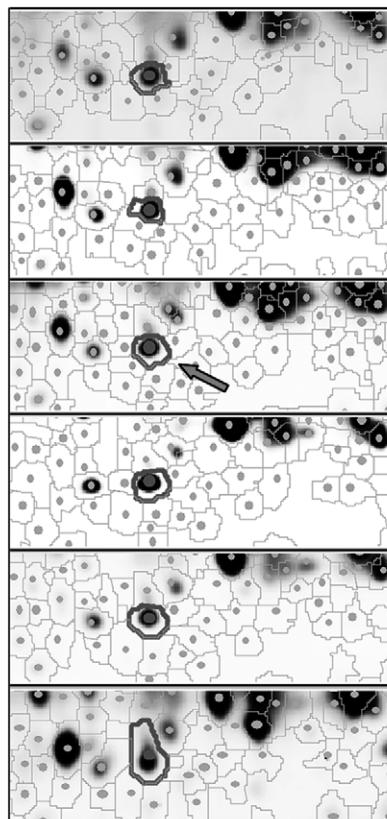
Conversely, FAA maintained steady expression levels across paired omental and subcutaneous fat samples. Neither had FAA been studied in adipose tissue yet; this protein acts as the terminal enzyme in the tyrosine catabolism pathway, and its defects cause an autosomal recessive inborn error of metabolism named Type 1 tyrosinemia (HT) which has been studied mostly in liver and kidney, two of the organs affected in this disorder [38]. To our knowledge no proteins with comparable expression levels between omental and subcutaneous adipose tissue have been reported yet. Immunohistochemical analysis using an FAA antibody provided further evidence, as mesothelial cells in omental adipose tissue fail to stain (Figure 5).

**A****C****B**

Control

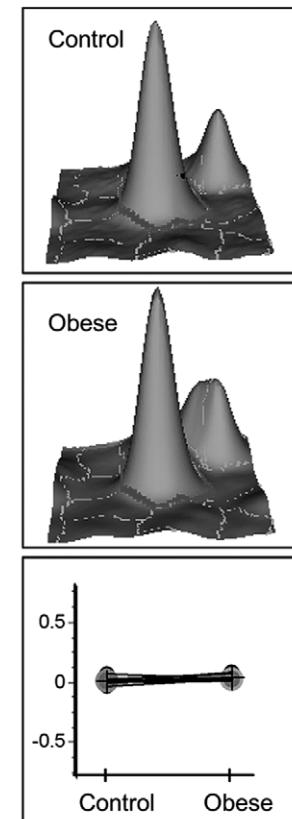


Obese



Control

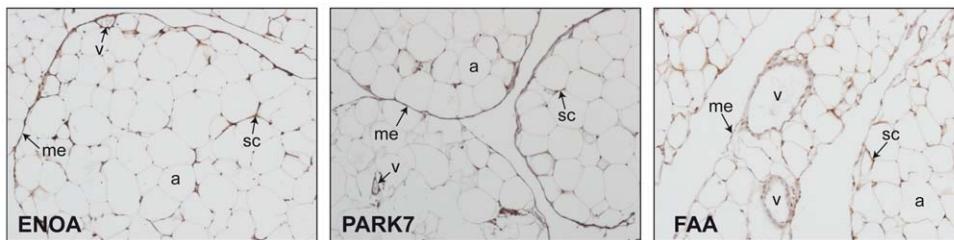
Obese



**Figure 4. Proteins identified by 2D-DIGE and MS showing sustained expression levels in omental adipose tissue from non-obese and obese subjects.** Protein extracts from omental fat of obese and non-obese subjects were analyzed by 2D-DIGE as described [19]. A selected silver-stained gel is shown with spots numbered as indicated in Table 1 (A). Sustained expression of PARK7 in obese and non-obese (control) subjects by DeCyder analysis. Zoomed images of 2D-DIGE gels around PARK7 spot (circled), 3D-view of selected spots (arrow) and graphical representation of the Standardized Abundance (Log) of PARK7 spot is shown (B). Representative Western Blot analysis of ENOA, PARK7 and FAA expression in omental fat samples from non-obese and obese subjects. Relative intensity values from band densitometry are expressed as mean  $\pm$  SD (C).

In summary, we have unveiled that neither customary GAPDH and TBB5 nor CALX can be regarded proper loading controls in differential protein expression studies on adipose tissue. Consequently, using proteomic approaches we have demonstrated that Beta-actin, ENOA and PARK7 are the most

adequate reference standards in obesity studies based on human omental adipose tissue, whilst FAA is the best loading control for the comparative analysis of omental and subcutaneous fat depots. The use of the reference proteins proposed in this work will facilitate the adequate analysis of proteins differentially expressed



**Figure 5. Immunohistochemical detection of ENOA, PARK7 and FAA in omental adipose tissue.** Images are representative of adipose tissue sections collected from five subjects. Magnification  $\times 100$ . **a**, adipocyte; **me**, mesothelium; **sc**, stromal cells; **v**, vessel.  
doi:10.1371/journal.pone.0030326.g005

in adipose tissue in the context of obesity, a goal difficult to meet before this study.

## Supporting Information

**Figure S1 Protein expression levels in omental adipose tissue from non-obese and non-diabetic, and type 2 diabetic obese subjects.** Representative Western Blot analysis of ENOA, PARK7, FAA, Beta-actin, GAPDH, TBB5 and CALX expression in omental fat samples from non-obese and non-diabetic (control), and type 2 diabetic obese subjects. ENOA, PARK7 and Beta-actin proteins show steady expression profiles across samples with CV of 13%, 20% and 28% respectively. Relative intensity values from band densitometry are expressed as mean  $\pm$  SD. (TIF)

## References

1. Aldridge GM, Podrebarac DM, Greenough WT, Weiler IJ (2008) The use of total protein stains as loading controls: an alternative to high-abundance single-protein controls in semi-quantitative immunoblotting. *J Neurosci Methods* 172: 250–254.
2. Ferguson RE, Carroll HP, Harris A, Maher ER, Selby PJ, et al. (2005) Housekeeping proteins: a preliminary study illustrating some limitations as useful references in protein expression studies. *Proteomics* 5: 566–571.
3. Dittmer A, Dittmer J (2006) Beta-actin is not a reliable loading control in Western blot analysis. *Electrophoresis* 27: 2844–2845.
4. Spiegelman BM, Flier JS (2001) Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 104: 531–543.
5. Fox CS, Massaro JM, Hoffmann U, Pou KM, Maurovich-Horvat P, et al. (2007) Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation* 116: 39–48.
6. Matsuzawa Y (2006) Therapy Insight: adipocytokines in metabolic syndrome and related cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 3: 35–42.
7. Prokesch A, Hackl H, Hakim-Weber R, Bornstein SR, Trajanoski Z (2009) Novel insights into adipogenesis from omics data. *Curr Med Chem* 16: 2952–2964.
8. Rasche A, Al-Hasani H, Herwig R (2008) Meta-analysis approach identifies candidate genes and associated molecular networks for type-2 diabetes mellitus. *BMC Genomics* 9: 310.
9. del Pozo CH, Calvo RM, Vesperinas-Garcia G, Gomez-Ambrosi J, Fruhbeck G, et al. (2011) Expression profile in omental and subcutaneous adipose tissue from lean and obese subjects. Repression of lipolytic and lipogenic genes. *Obes Surg* 21: 633–643.
10. Perez-Perez R, Ortega-Delgado FJ, Garcia-Santos E, Lopez JA, Camafeita E, et al. (2009) Differential proteomics of omental and subcutaneous adipose tissue reflects their unalike biochemical and metabolic properties. *J Proteome Res* 8: 1682–1693.
11. Vohl MC, Sladek R, Robitaille J, Gurd S, Marceau P, et al. (2004) A survey of genes differentially expressed in subcutaneous and visceral adipose tissue in men. *Obes Res* 12: 1217–1222.
12. Gesta S, Bluher M, Yamamoto Y, Norris AW, Berndt J, et al. (2006) Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 6676–6681.
13. van Beek EA, Bakker AH, Kruijt PM, Hofker MH, Saris WH, et al. (2007) Intra- and interindividual variation in gene expression in human adipose tissue. *Pflugers Arch* 453: 851–861.
14. MacLaren R, Cui W, Simard S, Cianflone K (2008) Influence of obesity and insulin sensitivity on insulin signaling genes in human omental and subcutaneous adipose tissue. *J Lipid Res* 49: 308–323.
15. Peinado JR, Jimenez-Gomez Y, Pulido MR, Ortega-Bellido M, Diaz-Lopez C, et al. (2010) The stromal-vascular fraction of adipose tissue contributes to major differences between subcutaneous and visceral fat depots. *Proteomics* 10: 3356–3366.
16. Hurtado del Pozo C, Calvo RM, Vesperinas-Garcia G, Gomez-Ambrosi J, Fruhbeck G, et al. (2010) IPO8 and FBXLI0: new reference genes for gene expression studies in human adipose tissue. *Obesity (Silver Spring)* 18: 897–903.
17. Catalan V, Gomez-Ambrosi J, Rotellar F, Silva C, Rodriguez A, et al. (2007) Validation of endogenous control genes in human adipose tissue: relevance to obesity and obesity-associated type 2 diabetes mellitus. *Horm Metab Res* 39: 495–500.
18. Gabrielson BG, Olofsson LE, Sjogren A, Jernas M, Elander A, et al. (2005) Evaluation of reference genes for studies of gene expression in human adipose tissue. *Obes Res* 13: 649–652.
19. Perez-Perez R, Garcia-Santos E, Ortega-Delgado FJ, Lopez JA, Camafeita E, et al. (2011) Attenuated metabolism is a hallmark of obesity as revealed by comparative proteomic analysis of human omental adipose tissue. *Journal of Proteomics*; doi:10.1016/j.jprot.2011.09.016.
20. Suckau D, Resemann A, Schuerenberg M, Hufnagel P, Franzen J, et al. (2003) A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Anal Bioanal Chem* 376: 952–965.
21. Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20: 3551–3567.
22. Sun S, Yi X, Poon RT, Yeung C, Day PJ, et al. (2009) A protein-based set of reference markers for liver tissues and hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 9: 309.
23. Wu X, Hoffstedt J, Deeb W, Singh R, Sedkova N, et al. (2001) Depot-specific variation in protein-tyrosine phosphatase activities in human omental and subcutaneous adipose tissue: a potential contribution to differential insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 5973–5980.
24. Gregor MF, Yang L, Fabbri E, Mohammed BS, Eagon JC, et al. (2009) Endoplasmic reticulum stress is reduced in tissues of obese subjects after weight loss. *Diabetes* 58: 693–700.
25. Boden G, Duan X, Homko C, Molina EJ, Song W, et al. (2008) Increase in endoplasmic reticulum stress-related proteins and genes in adipose tissue of obese, insulin-resistant individuals. *Diabetes* 57: 2438–2444.

**Table S1 Clinical characteristics of the individuals included in this study.**

(DOC)

## Acknowledgments

We greatly appreciate the technical help of Ana de la Encarnación and Javier Pérez (Instituto de Investigaciones Biomédicas, Alberto Sols, CSIC). We also acknowledge all the patients included in this study.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RP-P EG-S FJO-D JAL EC WR JMF-R BP. Performed the experiments: RP-P EG-S JAL EC MG-S. Analyzed the data: RP-P JAL EC JMF-R BP. Contributed reagents/materials/analysis tools: FJO-D JAL EC. Wrote the paper: RP-P JAL EC BP.

26. Sharma NK, Das SK, Mondal AK, Hackney OG, Chu WS, et al. (2008) Endoplasmic reticulum stress markers are associated with obesity in nondiabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 4532–4541.
27. Mantovani G, Bondioni S, Alberti L, Gilardini L, Invitti C, et al. (2009) Protein kinase A regulatory subunits in human adipose tissue: decreased R2B expression and activity in adipocytes from obese subjects. *Diabetes* 58: 620–626.
28. Bashan N, Dorfman K, Tarnovski T, Harman-Boehm I, Liberty IF, et al. (2007) Mitogen-activated protein kinases, inhibitory-kappaB kinase, and insulin signaling in human omental versus subcutaneous adipose tissue in obesity. *Endocrinology* 148: 2955–2962.
29. Kovsan J, Bluher M, Tarnovski T, Kloting N, Kirshtein B, et al. (2011) Altered autophagy in human adipose tissues in obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 96: E268–277.
30. Despres JP, Lemieux I (2006) Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 444: 881–887.
31. van Hinsbergh VW, Kooistra T, Scheffer MA, Hajo van Bockel J, van Muijen GN (1990) Characterization and fibrinolytic properties of human omental tissue mesothelial cells. Comparison with endothelial cells. *Blood* 75: 1490–1497.
32. Kim RH, Peters M, Jang Y, Shi W, Pintilie M, et al. (2005) DJ-1, a novel regulator of the tumor suppressor PTEN. *Cancer Cell* 7: 263–273.
33. Kahle PJ, Waak J, Gasser T (2009) DJ-1 and prevention of oxidative stress in Parkinson's disease and other age-related disorders. *Free Radic Biol Med* 47: 1354–1361.
34. Rai P, Shivaaji S (2011) The role of DJ-1 in the pathogenesis of endometriosis. *PLoS One* 6: e18074.
35. Liu S, Yang Z, Wei H, Shen W, Liu J, et al. (2010) Increased DJ-1 and its prognostic significance in hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 57: 1247–1256.
36. McNally RS, Davis BK, Clements CM, Accavitti-Loper MA, Mak TW, et al. (2011) DJ-1 enhances cell survival through the binding of Cezanne, a negative regulator of NF-kappaB. *J Biol Chem* 286: 4098–4106.
37. Zhang L, Shimoji M, Thomas B, Moore DJ, Yu SW, et al. (2005) Mitochondrial localization of the Parkinson's disease related protein DJ-1: implications for pathogenesis. *Hum Mol Genet* 14: 2063–2073.
38. Tanguay RM, Valet JP, Lescault A, Duband JL, Laberge C, et al. (1990) Different molecular basis for fumarylacetoacetate hydrolase deficiency in the two clinical forms of hereditary tyrosinemia (type I). *Am J Hum Genet* 47: 308–316.