

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

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

Elena González Muñoz
Tesis Doctoral
Barcelona, 2007

Programa de doctorado de Biomedicina II, bienio 2002-2004 del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Barcelona

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA EN BIOLOGÍA

Presentada por

Elena González Muñoz

La directora:

El tutor

La doctoranda:

Marta Camps Camprubí

Antonio Zorzano Olarte

Elena González Muñoz

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Universidad de Barcelona

Barcelona, 2007

Hacer la tesis ha supuesto una etapa en mi vida más importante de lo que sospeché cuando decidí venir a Barcelona. Por eso, en primer lugar quiero nombrar a mi compañero de esta "aventura". Empezamos esto juntos, con una ilusión enorme, todavía me acuerdo de nuestros planes charlando en Reina Mercedes. Luego vinieron nuestras decepciones con este mundillo y agobios, por qué no decirlo, que hemos tenido unos cuantos de días malos, ¿eh? Aunque también risas ha habido unas cuantas, tú para eso eres el mejor. Te quiero agradecer precisamente eso, tu buen humor, eres el alma de la fiesta, muchas gracias también por tu apoyo y por tu confianza en mí, por tomar siempre en serio mis ideas, yo también lo hago contigo. He tenido mucha suerte de haberte conocido, y de haber compartido tantas asignaturas, viajes y experiencias. Compañero es el que acompaña, ¿no? Pues eso, un placer.

Marta, te agradezco el trato tan amable que me diste los primeros días en este laboratorio cuando no conocía a nadie. Gracias por haberme permitido trabajar en un ambiente agradable y sin tensiones, y por preocuparte siempre por mí antes que por los experimentos.

Sin la ayuda del equipo de los servicios científico técnicos del Parc Científic esta tesis no se habría podido realizar. Admiro y agradezco el trabajo realizado por Carmen López del servicio de microscopía electrónica.

En el laboratorio tengo que agradecer a todo el equipo "insulina" por participar en esta tesis.

A Antonio Zorzano quisiera agradecerle su cordialidad y sus aportaciones a nuestro proyecto. En los seminarios, Manuel Palacín me ha ayudado mucho con su mente tan crítica. A Josep agradecerle tener siempre un momento para mis dudas y protocolos. Luc, me río mucho contigo, y así da gusto trabajar, además el idioma fusión andaluz-francés yo creo que funciona, ¿lo patentamos rey de la empresa? Mr. Green, amigo de todos, sin distinción, los nuevos (todos lo hemos sido) te agradecemos tu acogida.

Desde luego, muchas gracias Jose Carlos por tu implicación en los seminarios, siempre tienes ideas y preguntas que van al grano. Estoy segura de que te irá genial, eres un científico extraordinario. Carles, "maestro", quien tuviera tu labia para encandilar al tribunal... gracias a los dos fundadores de la cervecita de los viernes por ser siempre tan simpáticos conmigo. Al crack de las PCRs, Hans, muchas gracias por resolver todas mis dudas genómicas e informáticas, cuando te vayas, ya te digo yo que esto se va a pique. Espe, que simpática que eres, que lástima que te fueras tan prontito, aprendía mucho contigo.

Susanna y Lorena, las nenas de arriba, muchas gracias por escucharme los rollos, y por dar tan buen ambientillo en bio (y fuera, no os penséis). Estoy segura de que os irá la mar de bien. Mercè, también esto va por ti, pero además quería desearte mucha suerte en tu nueva etapa. Vicente y Eleonora, os quedáis solitos en bio, suerte!

A los postdocs palacinos, Albert, da gusto encontrarse por la mañana a gente tan amable, Eva supermami científica, Jose Luis... right?, suerte en tus proyectos. Joana, contigo el debate está servido a la hora del café.

Manu, eres una madraza, te agradezco tu serenidad y tus buenas palabras. Vicent, gracias por tu ayuda con las "Real Time". Silvia, gracias por ofrecerte siempre a echar un cable. Jèssica, a todo te apuntas, así me gusta! Déborah te agradezco tu ayuda con las secuencias. Víctor, has heredado las 10 horas semanales de cultivos, no las desperdicies! Ánimo y suerte.

Gràcies als nencs del laboratori... mi compi de penas, Marc! Nano, molta sort amb la recta final! Et sortirà tot genial, segur. Jordi, com tu deies, et trobaré a faltar, (no sé como puedo estar poniendo esto), i mal que et pesi, tu a mi també. Jonàs, molta sort amb tot el facis, aquí o a les illes, ha estat un plaer tenir-te per aquí. A mi portuu! La más estilosa, con diferencia...a ver si se nos pega algo tuyo hija. Tendríamos que aprender de ti a relativizar los problemas.

Las nuevas incorporaciones Ana, Maribel, Carolina (ya no tan nuevas, pero claro, por comparación...) se merecen un diez.

Paola guapa, muchas gracias por tu buen humor, por ser tan agradable, sabes? Me encanta que por la mañana lo primero que haces es saludarme tranquilamente y preguntar, ¿qué tal todo? Siempre he pensado que transmites paz. Gracias por tus cenas y por estar tan cerca. Laura, y a ti, no sé si ponerte en los agradecimientos, o directamente irme a encargarte el monumento. Primero, tengo que decirte que eres la persona más leal y con más principios que conozco, me encanta. Gracias por dedicarme tanto tiempo. Por supuesto, que todo el mundo sepa que sin tu soporte informático, ni esta tesis, ni otras doce, ni algún que otro artículo, estarían donde están. Sara, nena! Se te echa tanto de menos por aquí... Suerte, que ya andas por Catalonia, y al menos nos podemos ver. Muchas gracias por preocuparte tanto por mi, por estar conmigo, y por el Sant Joan de 2005.

Alfons, el meu únic company de projecte, m'alegro moltíssim que tot t'estigui anant tan bé. Gràcies per les teves cançons que animaven a tothom, per el teu esforç y les teves ganys. Llàstima que haguessis de marxar. Otra desaparecida, Meri Peque, todavía me acuerdo de cuando empezamos con los virus, que de quebraderos de cabeza! Siempre ofrecida para ayudar y con la mejor cara, falta gente como tú.

Bueno, el equipo técnico: Ruth, guapa, al final no te quedaste lo suficiente para verme leer. No te imaginas lo que se nota que no andas por aquí, esto es un aburrimiento! Me encantan tus salidas fuera de tono, y los razonamientos rutianos, soy fan tuya! Sigue tan bien. Susanna, cuando te recuperes, y encuentres niñera, claro, nos vamos otra vez de marcha? Eli, nena, que bien que al final diste el paso y te fuiste a hacer la tesis, eres de lo mejorcito que hemos tenido por aquí, mucha suerte! Judith, a ti te meto en este grupito, gracias por tu buen humor y por intentar ayudar siempre al "colectivo precario". A mis compis de pasillo, Miriam, siempre divina, los intercambios de pasos de baile no han prosperado, pero al menos nos reíamos un rato. Juan Carlos, el hombretón del equipo, muchas gracias por apoyarme, nadie más me ha llamado doctora un año y medio antes de leer la tesis, eso sí que es fe!

Ahora toca acordarme de todos los de Bellvitge, hace ya más de cuatro años que me fui de allí y cada vez que vuelvo me tratáis con el mismo cariño que el primer día. Muchas gracias a todos los profesores, postdocs y doctorandos, me hicisteis sentir como en casa nada más llegar a Barcelona.

Por supuesto no me olvido de mi mentor en el laboratorio, tuve mucha suerte de entrar en micro contigo. Gracias por enseñarme a pipetear, ser ordenada, buscar en las bases de datos, entender protocolos... Todo lo que nadie te enseña pero hay que saber. Qué bien que sigamos en contacto.

A mis nenas, Mercè, Cristina, Roser, Maria José, no me quiero poner pastelosa, pero muchas, muchas gracias por las cervecitas, regalos, visitas, charlas, llamadas de teléfono, fiestas, días de playa, "sopars de nenes" ... vamos, lo que es vida fuera del laboratorio.

Dianita! Mi primera amiga en Barcelona, incluso antes de conocerte!. Te escribiría una página entera pero entonces sí que me pondría empalagosa. Muchas gracias por acogerme cuando andaba más sola que la una, y por seguir cerquita mía. Danidianita, ojalá volviéramos a hacer algún viaje juntos, tienes un don especial para hacer que te sientas a gusto. A Andrés, el hombre más "apañao" que conozco, gracias por tu buen humor y tus detalles caseros.

No me puedo olvidar de mis amigos de Sevilla, tengo el mejor recuerdo de los años de universidad, y ahora seguís conmigo, que suerte! Moi, Isa, Rosario, Pablo, Maria del Mar, Maria Jesús, Puyana... No sabéis lo que me encanta ir a veros, y que vengáis, lo bien que me lo paso y lo tranquila que estoy con vosotros.

Y por supuesto, mi familia. Mi madre es un ejemplo de inteligencia emocional y comprensión. Hace más de 10 años que no vivo en casa y tu consigues que siempre que vuelva encuentre ese ambiente tan sereno que me encanta. Mi padre me ha enseñado a

trabajar duro, la pereza no va contigo, es admirable tu gran espíritu de superación y sacrificio. Gracias por decirme lo estupenda que soy, aunque muchas veces no me lo creo, esto siempre cala. A Javi, desde que era pequeña me encanta andar contigo (incluso perseguirte), un hermano es un hermano, por más lejos que estemos.

Por último, Enric, siempre te lo digo, que suerte habernos encontrado. Gracias por tu comprensión, por escucharme, por tus piropos, por hacerme la cena toodos los días, y sobre todo, por el cariño que me das.

Muchas gracias a todos los habéis compartido conmigo estos años, ahora estoy muy contenta de podérslo agradecer dentro de esta tesis.

INTRODUCCIÓN.....	15
1 Definición y características de los <i>rafts</i> lipídicos	1
1.1 Proteínas asociadas a los <i>rafts</i> lipídicos	4
1.2 Formación y distribución de los <i>rafts</i> lipídicos.....	5
1.3 Función de los <i>rafts</i> lipídicos.....	5
1.4 <i>Rafts</i> lipídicos y caveolas	6
2 Caveolas y caveolina.....	7
2.1 La familia de las caveolinas	8
2.2 Estructura de las caveolinas	9
2.3 Formación de las caveolas.....	11
2.4 Función de las caveolas y caveolinas.....	13
2.4.1 Papel de las caveolas en el tráfico de membranas.....	13
2.4.1.1 Endocitosis mediada por caveolas.....	13
2.4.1.2 Papel de las caveolas en la salida (<i>budding</i>) de los virus	15
2.4.1.3 Caveolas y adhesión celular	16
2.4.1.4 Otros procesos de tráfico de membranas: transcitosis y potocitosis... 16	
2.4.2 Papel de las caveolas/caveolinas en la transducción de señales.....	17
2.4.3 Papel de las caveolas/caveolina en la homeostasis y el transporte de colesterol	18
2.4.4 Caveolina y gotas lipídicas	19
2.4.5 Caveolina y transformación celular y tumorigénesis	21
2.4.6 Funciones fisiológicas de las caveolas/caveolina a partir del fenotipo de los ratones deficientes en caveolina-1	23
3 Fisiología y metabolismo de los adipocitos	25
3.1 Proceso de diferenciación adipocitaria	26
3.2 Metabolismo glucídico en el adipocito: acción de la insulina sobre el transporte de glucosa	29
3.2.1 Los transportadores de glucosa (GLUTs): GLUT4.....	30
3.2.1.1 Localización intracelular de GLUT4	31
3.2.1.2 Tráfico de GLUT4.....	31
3.2.1.3 Vía de señalización de la insulina.....	33
3.3 Metabolismo lipídico del adipocito: transporte de ácidos grasos de cadena larga a través de la membrana plasmática.	35
3.4 Regulación de la lipólisis en los adipocitos.	38
3.4.1 Principales enzimas implicadas en la hidrólisis de los triacilglicéridos	39
3.4.2 Papel de las proteínas asociadas a la gota lipídica en la lipólisis.....	40
3.4.3 Mecanismos de regulación hormonal de la lipólisis en los adipocitos	41
3.4.3.1 Estimulación de la lipólisis	42
3.4.3.2 Inhibición de la lipólisis.....	42
OBJETIVOS.....	44
RESULTADOS	46
1 Efecto de agentes que se unen o extraen colesterol de la membrana plasmática sobre la estructura y función de los <i>rafts</i> lipídicos/caveolas en adipocitos 3T3L1	46
1.1 Estructura de las caveolas/ <i>rafts</i> lipídicos tras el tratamiento con agentes descolesterolizantes	46
1.2 Efecto de los tratamientos sobre el transporte de glucosa en adipocitos 3T3L1 .	47

1.3	Efecto de los tratamientos sobre las dos vías de señalización de la insulina que provoca la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática: la mediada por Cbl/TC10 y la dependiente de PI3kinasa	48
1.4	Efecto de los tratamientos sobre la lipólisis en adipocitos 3T3L1	50
1.5	Efecto de los tratamientos sobre la lipogénesis.....	53
2	Obtención de líneas 3T3L1 deficientes en caveolina-1 mediante silenciamiento génico posttranscripcional (<i>RNA interference</i>).....	54
2.1	Selección de las secuencias de <i>small interference</i> RNA (siRNA) para caveolina-1 murina mediante el ensayo de silenciamiento génico posttranscripcional en células HeLa que expresan de forma estable caveolina-1	55
2.2	Clonación de las secuencias seleccionadas en el vector lentiviral pLVTHM, producción en células Hek293T y puesta a punto del protocolo de infección de preadipocitos 3T3L1	58
2.3	Generación de líneas estables de preadipocitos 3T3L1 deficientes en caveolina-1 y su posterior diferenciación a adipocitos.....	61
3	Estudio de las caveolas / <i>rafts</i> lipídicos en los adipocitos 3T3L1 deficientes en caveolina-1	68
3.1	Análisis de la presencia de caveolas en la membrana plasmática mediante microscopía electrónica.....	68
3.2	Análisis de los <i>rafts</i> lipídicos en los adipocitos deficientes en caveolina-1	73
3.2.1	Localización del gangliósido GM1 (en un fraccionamiento celular a lo largo de un gradiente de sacarosa).....	73
3.2.2	Estudio de los marcadores proteicos de <i>rafts</i> lipídicos/caveolas.....	75
4	Análisis de la diferenciación a adipocitos de los preadipocitos 3T3L1 deficientes en caveolina-1	78
4.1	Análisis de la morfología y contenido lipídico de los adipocitos	78
4.1.1	Tinción Oil-red O.....	78
4.1.2	Inmunolocalización de perilipina.....	79
4.1.3	Cuantificación de triglicéridos y colesterol total en los adipocitos.....	80
4.2	Estudio de marcadores proteicos de diferenciación	82
4.2.1	Expresión de factores de transcripción	82
4.2.2	Expresión de marcadores característicos de adipocitos diferenciados ...	83
4.3	Estudio de la estabilidad/vida media de las proteínas receptor de insulina (IR) y GLUT4	87
5	Análisis de la acción de insulina.....	90
5.1	Análisis de la activación de las vías de señalización de la insulina.....	90
5.2	Estimulación del transporte de glucosa por insulina.....	92
5.3	Translocación de GLUT4 a la membrana plasmática.....	95
5.4	Internalización de GLUT4 durante la reversión de la acción de la insulina	97
5.5	Análisis de la implicación de la caveolina-1 en otras acciones de la insulina	100
6	Estudio del papel de la caveolina-1/ caveolas en el metabolismo lipídico del adipocito	103
6.1	Transporte de ácidos grasos a través de la membrana plasmática	103
6.2	Movilización del <i>pool</i> de triglicéridos (TAG) en adipocitos 3T3L1	104
6.2.1	Actividad lipolítica basal y estimulada por efectores β -adrenérgicos.....	105
6.2.2	Salida de ácidos grasos al medio extracelular	106
	DISCUSIÓN.....	108
1	Efecto de los agentes que unen o extraen colesterol de las membranas sobre la estructura y función de los <i>rafts</i> lipídicos/ caveolas en adipocitos 3T3L1	108

2	Obtención de líneas 3T3L1 deficientes en caveolina-1 mediante silenciamiento génico posttranscripcional.....	111
3	Estudio de las caveolas/ <i>rafts</i> lipídicos en los adipocitos 3T3L1 deficientes en caveolina-1	113
3.1	Análisis de la presencia de caveolas	113
3.2	Análisis de los <i>rafts</i> lipídicos en la membrana plasmática.....	114
4	Análisis de la diferenciación a adipocitos de los preadipocitos 3T3L1 deficientes en caveolina-1	115
4.1	Características morfológicas y contenido lipídico de los adipocitos	115
4.2	Marcadores proteicos de diferenciación	116
4.2.1	Análisis molecular del proceso de diferenciación.....	116
4.2.2	Expresión de marcadores proteicos de adipocitos maduros	117
4.3	Análisis de la estabilidad/vida media de las proteínas: receptor de insulina (IR) y GLUT4.	118
5	Importancia de la caveolina-1 en la señalización de insulina	120
5.1	Activación de las vías de señalización de la insulina y estimulación del transporte de glucosa	121
5.2	Papel de la caveolina-1/caveolas en la internalización de GLUT4 durante la reversión de la acción de la insulina.	122
5.3	Implicación de la caveolina-1 en otras acciones metabólicas de la insulina ..	124
6	Implicación de la caveolina-1 en el metabolismo lipídico del adipocito	126
6.1	Efecto de la carencia de caveolina-1 sobre el transporte de ácidos grasos a través de la membrana de los adipocitos.....	126
6.2	Efecto de la carencia de caveolina-1 sobre la lipólisis estimulada por efectores β -adrenérgicos.....	128
	CONCLUSIONES	130
	MATERIALES Y MÉTODOS	131
1	Cultivos celulares.....	131
1.1	Normas generales de manipulación.....	131
1.2	Líneas celulares	131
1.2.1	Línea celular 3T3L1	131
1.2.2	Línea celular HeLa	132
1.2.3	Línea celular Hek293.....	132
1.3	Medios de cultivo.....	132
1.3.1	Medio de cultivo de células HeLa y Hek293	132
1.3.2	Medio de cultivo de fibroblastos 3T3L1 (10% CS)	132
1.3.3	Medio de diferenciación 1.....	132
1.3.4	Medio de diferenciación 2.....	133
1.3.5	Medio de diferenciación 3 o de adipocitos 3T3L1	133
1.3.6	Medio de ayuno	133
1.3.7	Medio de congelación de células	133
1.4	Protocolo de división o subcultivo	133
1.5	Protocolo de congelación de células.....	134
1.6	Protocolo de descongelación	135
1.7	Detección de micoplasma	135
1.8	Diferenciación de las células 3T3L1	135
1.9	Transfección transitoria de líneas celulares.....	136
1.9.1	Método de precipitación con fosfato cálcico.....	136
1.9.2	Método de transfección usando PEI	138
1.9.3	Electroporación de adipocitos 3T3L1	139

1.9.4	Transfección de siRNA usando Lipofectamina 2000 de Invitrogen	140
1.10	Obtención de líneas HeLa estables.....	141
1.11	Contaje del número de células mediante el marcaje con yoduro de propidio..	142
2	Silenciamiento génico posttranscripcional mediante <i>RNA interference</i>	142
2.1	Diseño de los siRNA	142
2.2	Obtención de las moléculas de siRNA <i>in vitro</i>	143
2.2.1	Hibridación de cada oligonucleótido molde con el primer promotor de T7 ..	144
2.2.2	Reacción de la DNA polimerasa Klenow.....	144
2.2.3	Síntesis de los RNA de doble cadena.....	144
2.2.4	Digestión de los siRNA con RNasa y DNasa	145
2.3	Obtención de vectores lentivíricos que expresan siRNA en la célula.....	145
3	Producción de partículas lentivirales y transducción de células	147
3.1	Obtención de las partículas lentivirales.....	147
3.2	Titulación de las partículas lentivirales.....	149
3.3	Transducción de células 3T3L1 usando partículas lentivirales.....	150
4	Técnicas de microscopía.....	150
4.1	Obtención de láminas de membrana plasmática de células crecidas sobre cubreobjetos	150
4.2	Tinción "Oil Red O".....	151
4.3	Inmunolocalización de proteínas sobre células crecidas en cubreobjetos	152
4.4	Técnicas de microscopía electrónica	154
4.4.1	Preparación convencional para microscopía electrónica de transmisión.	154
4.4.2	Preparación de criosecciones	155
4.4.3	Técnica de <i>freeze-drying (freeze-etching)</i>	156
4.4.4	Inmunolocalización de caveolina-1 sobre fragmentos de membrana plasmática sometidos a la técnica de freeze-drying.....	158
5	Ensayos metabólicos y bioquímicos.....	158
5.1	Medida del transporte de glucosa en adipocitos 3T3L1	158
5.2	Medida del transporte de glucosa durante la reversión de la acción de la insulina en células 3T3L1.....	160
5.3	Medida de la lipogénesis de <i>novo</i> en adipocitos 3T3L1	160
5.4	Determinación de la lipólisis.....	161
5.4.1	Determinación del glicerol liberado a partir de la cantidad de NADH	161
5.4.2	Determinación de la cantidad de glicerol liberado mediante el método colorimétrico del Kit "Free Glycerol Reagent" de Sigma.	163
5.5	Medida del transporte de ácidos grasos de cadena larga (LCFA)	164
5.6	Medida de la salida de ácidos grasos al medio extracelular.....	166
5.7	Ensayos de internalización de la toxina colérica marcada con el fluorocromo (CTB-FITC).....	167
5.8	Ensayo de translocación e internalización de GLUT4 a y desde la membrana plasmática.	168
5.9	Determinación de triglicéridos en homogenados de adipocitos 3T3L1	169
5.10	Determinación del colesterol total en homogenados de adipocitos 3T3L1	170
5.11	Medida de la actividad lipasa en homogenados de adipocitos 3T3L1	171
6	Técnicas relacionadas con la obtención de proteínas	173
6.1	Obtención de proteínas totales de células en cultivo.....	173
6.2	Fraccionamiento subcelular de adipocitos 3T3L1.....	175

6.3	Obtención de membranas totales a partir de células.....	176
6.4	Aislamiento bioquímico de dominios <i>rafts</i> lipídicos/caveolas	177
6.4.1	Usando método de extracción con detergente Tritón-X-100 (Preparación de complejos de membrana insolubles en Tritón-X-100 (TICs)).....	177
6.4.2	Usando método de extracción sin detergente con carbonato sódico a pH11	178
6.5	Análisis de la velocidad de migración en un gradiente de sacarosa.	180
7	Técnicas de manipulación y detección de proteínas.....	181
7.1	Determinación de la concentración de proteínas.....	181
7.1.1	Método de Bradford.....	181
7.1.2	Método BCA de Pierce	181
7.2	Inmunoprecipitación de proteínas con anticuerpos específicos	182
7.3	Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE.....	183
7.4	Análisis western blot.....	185
7.4.1	Transferencia.....	186
7.4.2	Inmunodetección	186
7.5	Reutilización de membranas de PVDF en ensayos de <i>western blot: stripping</i> de las membranas	187
7.6	Tinción de geles con Coomassie Brilliant Blue	188
7.7	Inmovilización de proteínas y complejos de membrana por <i>dot blot</i>	188
7.8	Análisis de proteínas en geles de dos dimensiones	190
8	Ensayo de pulso y caza en adipocitos 3T3L1	192
9	Aislamiento de gotas lipídicas de adipocitos 3T3L1.....	194
9.1	Obtención de gotas lipídicas para el análisis de sus proteínas asociadas.....	194
9.2	Obtención de los lípidos de adipocitos 3T3L1 para analizar su composición lipídica mediante TLC.....	195
10	Separación de lípidos por cromatografía en gel de capa fina (TLC).....	196
11	Técnicas de obtención, manipulación y detección de DNA	197
11.1	Obtención de bacterias competentes	198
11.2	Transformación	198
11.3	Recuperación de DNA plasmídico.....	199
11.4	Análisis de DNA con enzimas de restricción	199
11.5	Extracción de DNA con fenol-cloroformo y precipitación con etanol.....	200
11.6	Ligación.....	200
11.7	Clonación de productos de PCR en un vector pGEM-T Easy.....	201
11.8	Electroforesis de DNA en geles de agarosa.....	201
11.9	Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.....	201
11.10	Otros enzimas usados	202
11.11	Construcción de plásmidos por recombinación (sistema <i>gateway</i>).....	202
11.11.1	Método de recombinación del fago lambda.....	202
11.11.2	Vectores y sistema <i>Gateway</i> (Invitrogen) de recombinación	202
11.11.3	Construcción de entry clones: reacción <i>attB</i> x <i>attP</i>	203
11.11.4	Construcción de los vectores destino: reacción <i>attL</i> x <i>attR</i>	204
11.12	PCR.....	204
11.13	Secuenciación.....	205
12	Obtención y análisis de RNA.....	206
12.1	Obtención de RNA total	206
12.1.1	Aislamiento de RNA total a partir de células mediante el reactivo "Trizol". . .	206
12.1.2	Extracción de RNA mediante el kit "RNeasy" de Qiagen.....	206

12.1.3	Tratamiento del RNA con DNasas	207
12.2	Electroforesis del RNA en gel de agarosa-formaldehído	207
12.3	Obtención de cDNA a partir de RNA (RT-PCR)	207
12.4	Amplificación y detección de DNA mediante PCR a tiempo real	208
12.4.1	Diseño de los oligonucleótidos cebadores	208
12.4.2	Optimización de las condiciones de amplificación	209
12.4.3	Cebadores y condiciones de la PCR a tiempo real.....	209
13	Herramientas bioinformáticas	210
13.1	Descripción de las bases de datos utilizadas	210
13.2	Herramientas para el análisis de secuencias	211
13.2.1	Diseño de oligonucleótidos cebadores.....	212
13.3	Otras direcciones de interés	212
Apéndice I: Soluciones de uso general.....		213
Apéndice II: Anticuerpos utilizados		215
Apéndice III: Plásmidos y construcciones de DNA usados		215
ANEXO		218
1	Generación de líneas de preadipocitos 3T3L1 deficientes en caveolina-1 y en flotilina-1	218
1.1	Selección de las secuencias de miRNA y clonaje en vectores lentivirales	218
1.2	Infección de los preadipocitos 3T3L1 y detección de la expresión de caveolina-1 y flotilina-1	220
2	Infección de preadipocitos y adipocitos 3T3L1 con partículas lentivirales que codifican proteínas recombinantes.....	223
ABREVIATURAS		225
BIBLIOGRAFÍA.....		227