

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

## **RESULTADOS**



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

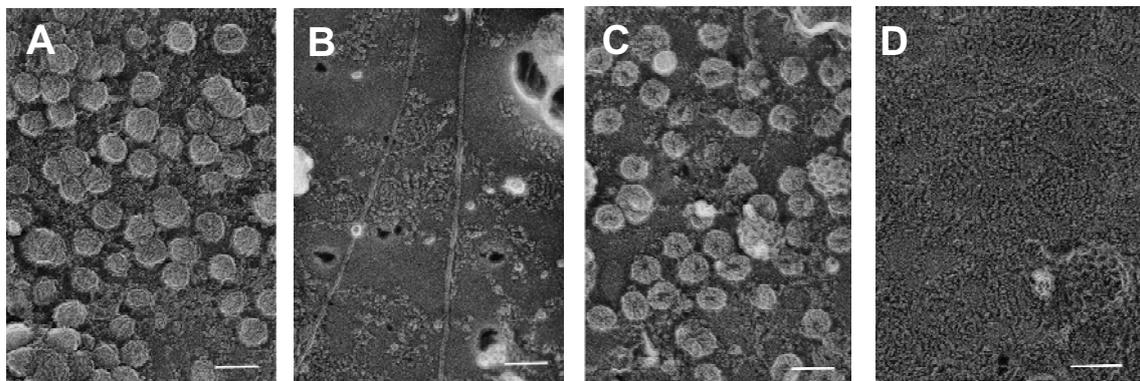
## 1.1 Estructura de las caveolas/*rafts* lipídicos tras el tratamiento con agentes descolesterolizantes

Nuestro primer objetivo consistió en comprobar que el tratamiento con agentes descolesterolizantes alteran la estructura de las caveolas/*rafts* lipídicos para poder analizar posteriormente su efecto sobre funciones asignadas a estos dominios de la membrana plasmática.

Están descritos en la bibliografía y en la tesis doctoral de Anna Ros Baró (Papel de los *rafts* lipídicos, caveolas y caveolinas en la fisiología del adipocito, 2004), diferentes agentes que son capaces de alterar la estructura de los *rafts* lipídicos mediante su unión al colesterol como son: la nistatina, la filipina, la  $\beta$ -ciclodextrina (CD) o la metil- $\beta$ -ciclodextrina (MCD) (Rothberg *et al.*, 1992; Orlandi *et al.*, 1998; Schnitzer *et al.*, 1994).

La nistatina y la filipina se unen al colesterol de la membrana plasmática formando complejos, pero en estas condiciones no se modifica la cantidad total de caveolina-1 de la membrana. La  $\beta$ -ciclodextrina es un pequeño oligosacárido cíclico con un núcleo hidrofóbico que de manera selectiva y rápida extrae el colesterol de las membranas. La metil- $\beta$ -ciclodextrina es un derivado de la  $\beta$ -ciclodextrina más eficiente en la extracción de colesterol. En ambos casos, la extracción de colesterol promueve la pérdida de caveolina-1 de la membrana plasmática.

Para ver qué efecto producían estos agentes sobre la morfología de las caveolas, la Dra. Anna Ros analizó fragmentos de membrana plasmática de adipocitos 3T3L1 obtenidos después de los tratamientos con los diferentes inhibidores (Filipina: 15 minutos 5 $\mu$ g/ml; Nistatina: 15 minutos 50 $\mu$ g/ml, MCD: 30 minutos 10mM). Los fragmentos de membrana plasmática fueron sometidos a la técnica de *freeze-drying* y se obtuvieron imágenes de las réplicas por microscopía electrónica.



**Figura 1. Morfología de las caveolas por microscopía electrónica, después de la incubación con diferentes tratamientos que actúan como quelantes de colesterol.** Réplica de fragmento de membrana plasmática procedente de A. adipocitos control. B. adipocitos tratados 15 minutos con nistatina 50 $\mu$ g/ml C. adipocitos incubados durante 15 minutos con filipina 5 $\mu$ g/ml D. adipocitos incubados durante 30 minutos con MCD 10mM. Escala 100nm.

En los fragmentos de membrana plasmática procedentes de adipocitos control de la Figura 1 A se observa la morfología típica de las caveolas, en forma de ovillo, que es debida a la disposición de los oligómeros de caveolina-1.

El tratamiento con nistatina (figura 1 B) provoca un aplanamiento de las caveolas, el tratamiento con filipina (figura 1 C) indujo que las caveolas adquiriesen forma de anillo, y finalmente el tratamiento con MCD (figura 1 D) provocó la desestructuración total de las caveolas.

Una vez demostrado que, tanto nistatina, filipina y MCD, a las concentraciones indicadas anteriormente, provocaban una alteración en la estructura de las caveolas, quisimos comprobar si, en estas condiciones, se veían afectadas alguna de las funciones que se le han asignado a los *rafts* lipídicos en la transducción de señales (Baumann *et al.*, 2000; Pessin *et al.*, 2000; Watson *et al.*, 2001; Chiang *et al.*, 2001; Saltiel *et al.*, 2003). En primer lugar, analizamos su implicación en la vía de señalización de la insulina, que lleva a la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática y por tanto al incremento del transporte de glucosa.

## **1.2 Efecto de los tratamientos sobre el transporte de glucosa en adipocitos 3T3L1**

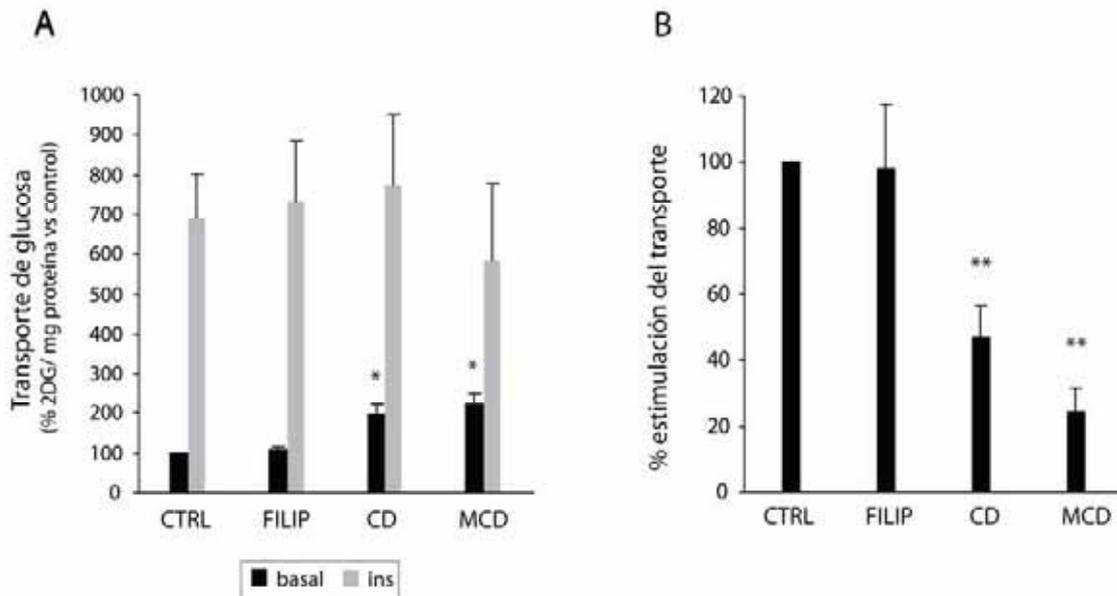
Está descrito en la bibliografía que los tratamientos con drogas que extraen el colesterol de la membrana plasmática disminuyen el transporte de glucosa estimulado por la insulina (Gustavsson *et al.*, 1999; Parpal *et al.*, 2001).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, y una vez caracterizado el efecto de los tratamientos que unen o extraen el colesterol de las membranas, sobre la morfología de las caveolas, quisimos comprobar su efecto sobre el transporte de glucosa basal y estimulado por insulina en adipocitos 3T3L1.

De esta manera, se midió el transporte de glucosa basal y estimulado por insulina 100nM durante 30 minutos, en condición control y después de tratar a los adipocitos con filipina 50µg/ml (filip) durante 15 minutos o bien, con β-ciclodextrina (CD) o metil-β-ciclodextrina 10mM (MCD) durante 50 minutos.

En la figura 2 A, se muestra la media del transporte de glucosa de 6 experimentos independientes, normalizada respecto a la media del transporte en la condición basal no tratado (CTRL). Se realizó el tratamiento estadístico t-student comparando cada grupo tratado con el grupo no tratado (CTRL) tanto en la condición basal como en la estimulada.

Como se observa en la figura 2 A, sólo los tratamientos que extraen el colesterol de la membrana (CD y MCD) consiguen aumentar el transporte de glucosa en una situación basal. En cambio, ninguno de los tratamientos aumenta el transporte de glucosa, cuando estimulamos los adipocitos durante 30 minutos con insulina 100nM. De esta forma, si representamos( figura 2 B) la estimulación del transporte de glucosa en cada grupo, respecto a la estimulación del transporte que provoca la insulina en el grupo no tratado, se observa que los tratamientos CD y MCD provocan una disminución de esta estimulación de un 50 % y un 70 %, respectivamente.



**Figura 2. Transporte de glucosa en condición basal y estimulado por insulina en adipocitos 3T3L1.** Los adipocitos 3T3L1 se incubaron en ausencia (CTRL) o en presencia de filipina 5  $\mu\text{g/ml}$  durante 15 minutos o bien con  $\beta$ -ciclodextrina 10mM (CD) o metil- $\beta$ -ciclodextrina 10mM (MCD) durante 50 minutos. Transcurrido este tiempo las células se incubaron 30 minutos con (barras grises; ins) o sin (barras negras; basal) insulina 100nM manteniendo los diferentes tratamientos. Se midió el transporte del análogo no metabolizable de la glucosa 2-deoxi-glucosa- $^3\text{H}$  (2DG) durante 5 minutos. En la figura 2 A, se muestra la media del transporte de glucosa de 6 experimentos independientes, normalizada *versus* la condición basal no tratada. El valor medio del transporte de glucosa basal en la condición control fue de 0,85 nmoles 2DG/mg proteína. En la figura 2 B se muestra el porcentaje de estimulación del transporte de glucosa en cada condición respecto a la estimulación en los adipocitos sin tratar (CTRL). \*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$ ; probabilidades del test t-student.

### 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

Existen numerosos antecedentes (Pessin *et al.*, 2000; Baumann *et al.*, 2000; Chiang *et al.*, 2001; Kanzaki *et al.*, 2002; Omata *et al.*, 2000; Kanzaki *et al.*, 2004) que muestran la importancia de las caveolas en la vía señalización de la insulina, que lleva a la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática desde compartimentos intracelulares, y por tanto, también al aumento del transporte de glucosa en adipocitos 3T3L1. (ver apartado 3.2.1.3 de la sección Introducción).

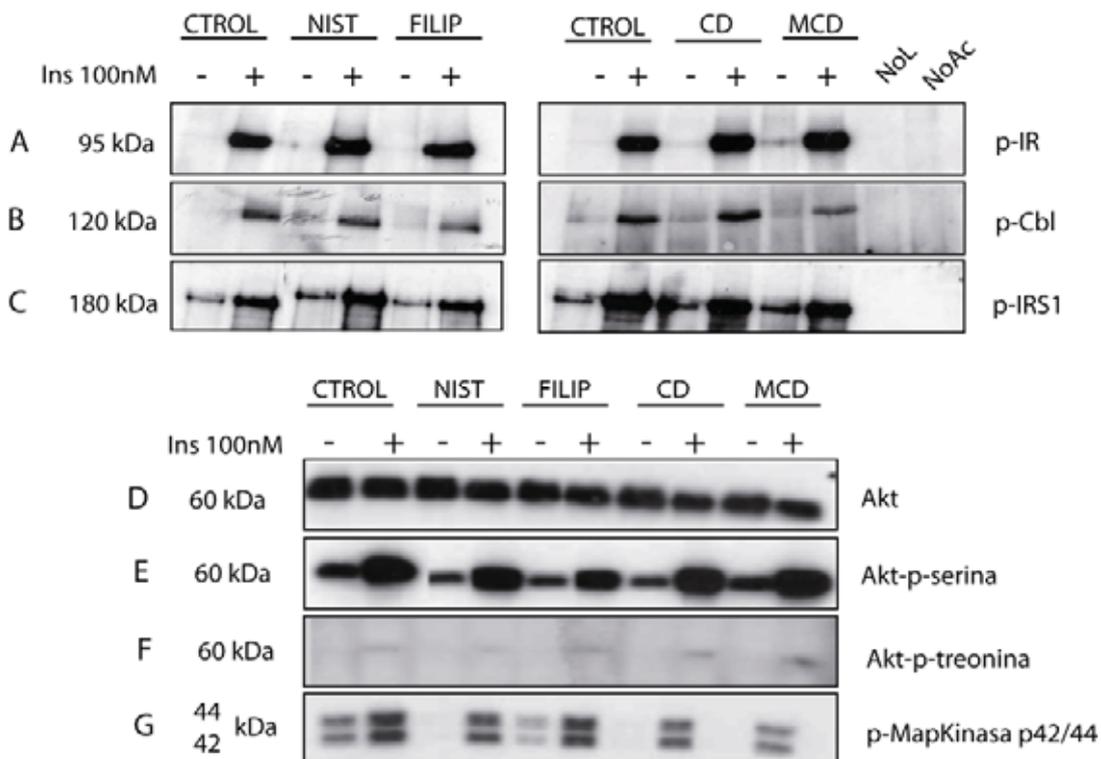
Los grupos de Pessin y Saltiel postulan que en esta acción de la insulina es indispensable la activación de dos vías de señalización: una dependiente de la activación de PI3K y otra independiente, la vía de Cbl/TC10, que está asociada a caveolas.

Recordemos que hemos observado que los agentes que extraen el colesterol de la membrana (CD y MCD) son capaces de disminuir la estimulación del transporte de glucosa que provoca la insulina en los adipocitos, debido fundamentalmente a que incrementan el transporte de glucosa en estado basal.

A continuación, nos planteamos analizar el efecto que provocan los tratamientos descritos, sobre estas vías de señalización de la insulina.

Para realizar este experimento partimos de adipocitos 3T3L1 ayunados durante dos horas. Después fueron sometidos a los diferentes tratamientos explicados en el apartado anterior (1.2). En este caso, además, usamos la droga nistatina 50 µg/ml (NIST) durante 15 minutos. Posteriormente se añadió la insulina 100nM durante 5 minutos. Los adipocitos se homogeneizaron en un tampón que contenía Igepal 1% (ver apartado 7.2 de la sección Materiales y Métodos) para solubilizar las proteínas

Con el fin de cuantificar la fosforilación en tirosinas de c-Cbl y del receptor de insulina (IR) inducida por la insulina, el sobrenadante obtenido tras la solubilización se inmunoprecipitó usando un anticuerpo anti-fosfotirosina y los inmunoprecipitados obtenidos se analizaron por western blot usando un anticuerpo anti-c-Cbl y otro anticuerpo que reconoce la cadena β de receptor de la insulina. De la misma forma, para comprobar la activación de IRS-1, durante la inmunoprecipitación usamos un anticuerpo anti-p85 (subunidad reguladora de la PI3K). Cuando IRS-1 está activo se fosforila en tirosinas y se une a p-85 y en el western blot usamos un anticuerpo anti-fosfotirosina. El análisis de la activación de Akt y MAPK se realizó por western blot a partir de lisados utilizando anticuerpos específicos: anti-Akt, anti-Akt-fosfoserina473, anti-Akt-fosfotreonina308 y anti-MAPK p44/42 fosforilada. El anticuerpo que usamos para detectar Akt y Akt-fosfoserina473 reconoce las isoformas Akt1/PKB α y Akt2/PKB β aunque en los adipocitos 3T3L1 la isoforma predominante es la Akt2/ PKB β.



**Figura 3. Activación de las vía de señalización de insulina.** Adipocitos 3T3L1 crecidos en placas de 10 cm de diámetro y, sin tratar (CTRL), o sometidas a los distintos tratamientos: β-ciclodextrina (CD) y metil-β-ciclodextrina (MCD) 10mM 50 minutos, nistatina 5µg/ml 15 minutos o filipina 5µg/ml 15 minutos fueron estimulados o no (+/-) con insulina 100nM durante 5 minutos antes de lisarlos en tampón A completo. 1mg del extracto celular fue usado para inmunoprecipitar con el anticuerpo anti-fosfotirosina (A y B) o anti-p85(C), la proteína inmunoprecipitada se analizó por western blot usando anti-IR (A), anti-Cbl (B) o anti- fosfotirosina (C). (NoL; no se puso extracto celular durante la inmunoprecipitación. NoAc; no se añadió anticuerpo durante la inmunoprecipitación). 100 µg del extracto celular se analizaron por western blot usando anti-Akt (D), anti-Akt-P-Ser (E), anti-Akt-P-Thr (F), o anti-P-MapKinasa-p42/44 (G).

La fosforilación del receptor de insulina (IR) no cambió por la acción de los tratamientos empleados (figura 3A), ni tampoco se modificó la fosforilación de IRS-1 asociado a PI3K (figura 3C). En cambio, la fosforilación de c-Cbl disminuyó aproximadamente un 50% sólo bajo el tratamiento con MCD (figura 3B). De la misma forma ningún tratamiento varió la fosforilación de Akt, excepto MCD que disminuyó un 40 % su fosforilación en serina (figura 3E). La fosforilación de MAPK en los residuos Thr202 y Tyr204 (importante componente del control mitogénico de la célula) tampoco cambió por efecto de los tratamientos que unen o extraen colesterol de las membranas.

#### 1.4 Efecto de los tratamientos sobre la lipólisis en adipocitos 3T3L1

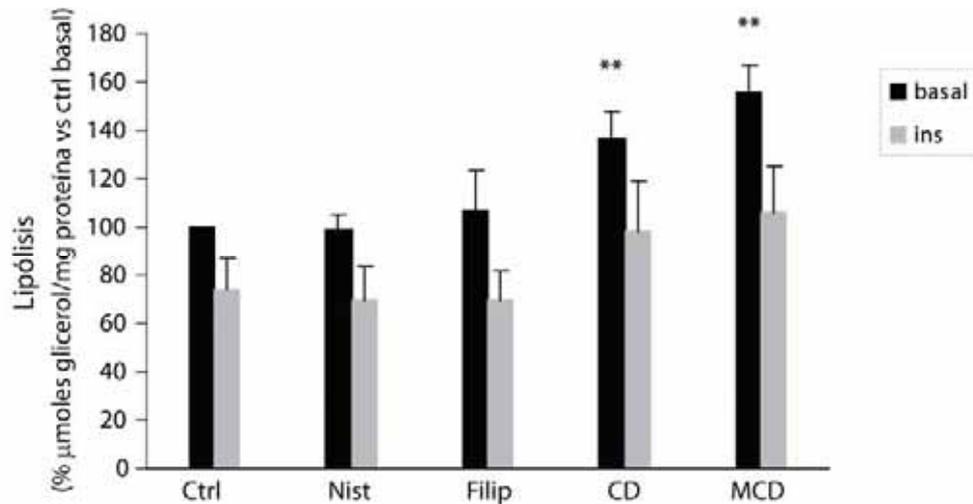
Nos planteamos definir otras acciones de la insulina cuyas vías de señalización pudieran estar asociadas y depender de la correcta estructura de los *rafts* lipídicos/caveolas, pero cuyo efecto no estuviese relacionado con el movimiento de vesículas. Nuestro objetivo era diferenciar estas otras vías de señalización de la vía Cbl/TC10, ya que TC10 se ha relacionado con la remodelación del citoesqueleto de actina que participa en el movimiento de vesículas, como el que ocurre en la translocación de GLUT4. Analizamos así, dos efectos importantes de la insulina sobre el metabolismo de los adipocitos: la inhibición de la lipólisis y la estimulación de la lipogénesis.

De nuevo utilizamos los tratamientos descritos en los apartados anteriores, agentes que unen o extraen colesterol de las membranas para alterar la estructura y/o composición de las caveolas, y analizamos si afectan a estas acciones de la insulina.

De esta manera, se midió la tasa de lipólisis valorando los nmoles de glicerol liberados al medio (ver apartado 5.4.1 de la sección Materiales y Métodos) durante 1 hora en estado basal (tras dos horas de ayuno) o estimulados con insulina 100nM, en adipocitos 3T3L1 sin tratar (CTRL) o tratados con nistatina 5µg/ml (nist) o filipina 50µg/ml (filip) durante 15 minutos o bien, con β-ciclodextrina 10mM(CD) o metil-β-ciclodextrina 10mM (MCD) durante 50 minutos

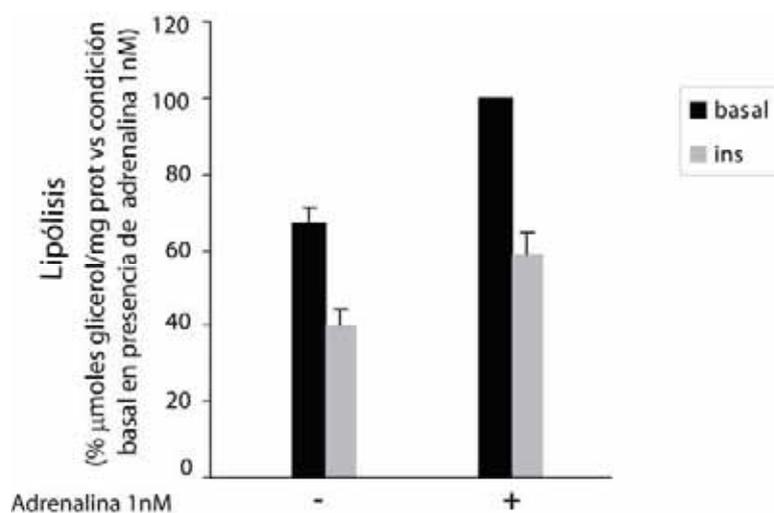
La figura 4 muestra la media de 6 experimentos independientes, en que se normalizó la tasa de lipólisis (como µmoles de glicerol liberado al medio/mg de proteína) de cada grupo tratado respecto a la condición sin tratamiento (control) basal. Se realizó el tratamiento estadístico t-student comparando el grupo control con cada grupo tratado tanto en condición basal como en presencia de insulina 100nM.

Los tratamientos que alteran la morfología y la composición de las caveolas (CD y MCD) aumentan la lipólisis basal un 35% y un 45% respectivamente, de manera estadísticamente significativa. En cambio, en presencia de insulina, aunque la lipólisis de estos grupos tratados es mayor que la del grupo control, esta diferencia no es significativa. Si calculamos el % de inhibición de la lipólisis por acción de la insulina, no observamos ninguna diferencia significativa entre el grupo control (26% ± 14 SD de inhibición) y los grupos tratados con CD y MCD (38% ± 21 SD y 49% ± 19 SD, respectivamente).



**Figura 4. Medida de la lipólisis en condiciones basal e inhibida por insulina en adipocitos 3T3L1.** Los adipocitos 3T3L1 se incubaron en ausencia (CTRL) o en presencia de nistatina (Nist) 5 $\mu$ g/ml o filipina 50 $\mu$ g/ml (Filip) durante 15 minutos o bien con  $\beta$ -ciclodextrina 10mM (CD) o metil- $\beta$ -ciclodextrina 10mM (MCD) durante 50 minutos. Transcurrido este tiempo las células se incubaron 1 hora con (barras grises; ins) o sin (barras negras; basal) insulina 100nM manteniendo los diferentes tratamientos, y se midió la lipólisis realizada como los  $\mu$ moles de glicerol liberados/mg de proteína en 1 hora. El valor medio de la lipólisis basal en la condición control fue de 1,24  $\mu$ moles de glicerol/mg proteína. En la figura aparecen las medias de 6 experimentos independientes, normalizadas *versus* la condición basal no estimulada (CTRL). \*\*  $P \leq 0,01$ ; probabilidades del test t-student.

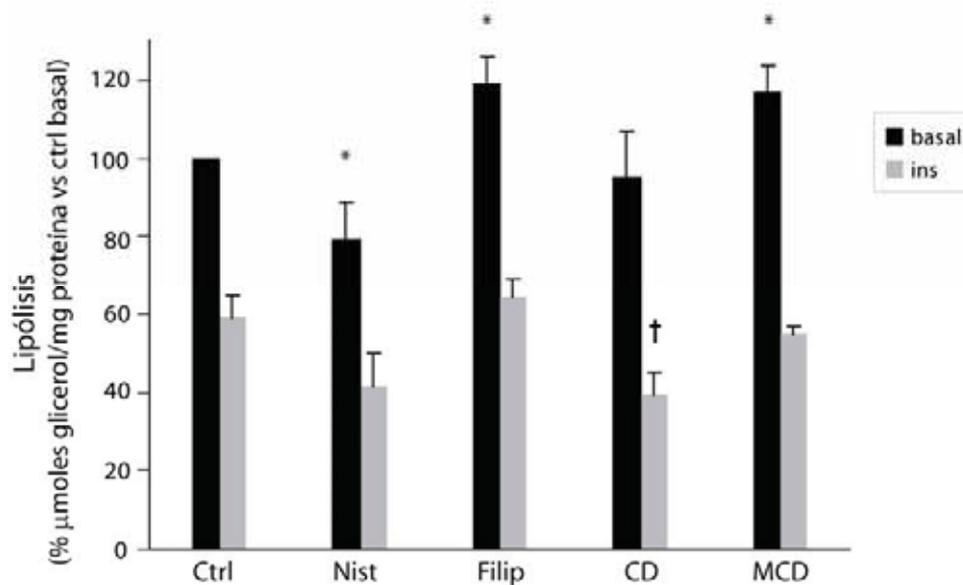
Decidimos realizar el mismo tipo de experimento pero en este caso (figura 6) todas las células fueron tratadas con adrenalina 1nM, que activa la lipólisis un 27% pero es una dosis suficientemente baja como para que la insulina, a la concentración de 100nM, siga ejerciendo su acción inhibitoria sobre la lipólisis (figura 5).



**Figura 5. Efecto de la adrenalina 1nM sobre la lipólisis basal y la estimulada por insulina.** Los adipocitos 3T3L1 se incubaron durante 1 hora, en presencia o ausencia de adrenalina 1nM, con (barras grises; ins) o sin (barras negras; basal) insulina 100nM. Se midió la lipólisis realizada como los  $\mu$ moles de glicerol liberados/mg de proteína en 1 hora. En la figura aparecen las medias de 3 experimentos independientes, normalizadas *versus* la condición basal estimulada con adrenalina 1nM (1,7  $\mu$ moles de glicerol/mg proteína).

Así, intentamos, por un lado, aumentar la diferencia entre la lipólisis basal y la inhibida por insulina de tal forma que fueran más visibles las posibles diferencias entre los grupos tratados o sin tratar. Por otro lado, además, comprobamos si la activación de la lipólisis por efectores  $\beta$ -adrenérgicos se veía modificada por los tratamientos empleados.

En este caso, la lipólisis basal (en ausencia de insulina) es ligeramente superior (20%) bajo los tratamientos con Filipina 50  $\mu\text{g/ml}$  15 minutos y MCD 10nM 50 minutos, e inferior con Nistatina 5 $\mu\text{g/ml}$  15 minutos, en cambio, la lipólisis en presencia de insulina aparece como significativamente menor con las drogas CD y nistatina. De nuevo, si calculamos el porcentaje de inhibición de la lipólisis debido a la insulina ( $40\% \pm 6$  SD de inhibición en el grupo control) no hay diferencias significativas con los grupos tratados: Nistatina  $37,4\% \pm 10$  SD; Filipina  $54,6\% \pm 9$  SD; CD  $55,2\% \pm 12$  SD; MCD  $61\% \pm 7$  SD. Como antes, estos tratamientos interfieren en la lipólisis de la célula, pero no lo hacen en la ruta de acción de la insulina.



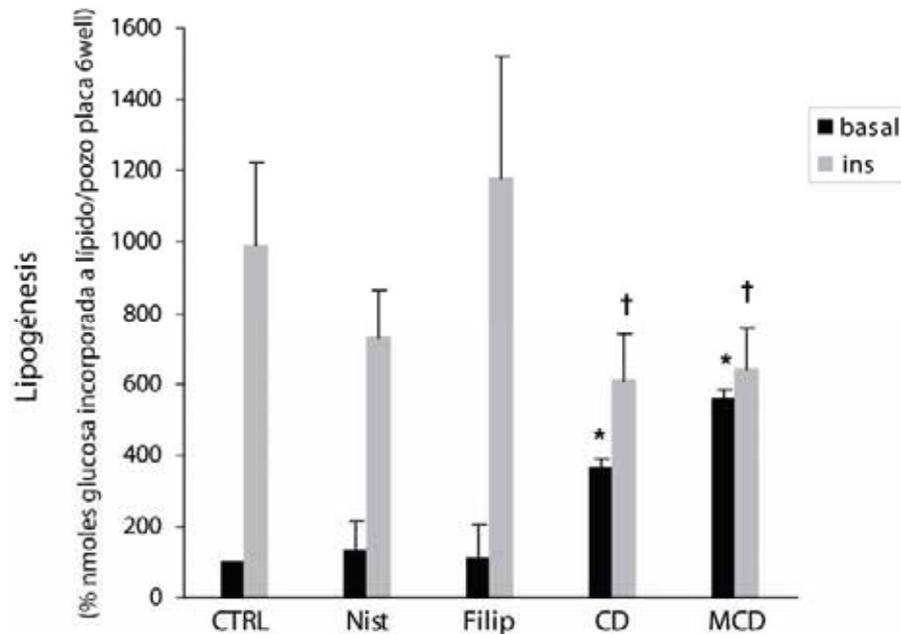
**Figura 6. Medida de la lipólisis en condiciones basal e inhibida por insulina en adipocitos 3T3L1 tratados con adrenalina 1nM.** Los adipocitos 3T3L1 se incubaron en ausencia (CTRL) o en presencia de nistatina (Nist) 5 $\mu\text{g/ml}$  o filipina 50 $\mu\text{g/ml}$  (Filip) durante 15 minutos o bien con  $\beta$ -ciclodextrina (CD) o metil- $\beta$ -ciclodextrina 10mM (MCD) durante 50 minutos. Transcurrido este tiempo las células se incubaron 1 hora, en presencia de adrenalina 1nM, con (barras grises; ins) o sin (barras negras; basal) insulina 100nM manteniendo los diferentes tratamientos. Se midió la lipólisis realizada como los  $\mu\text{moles}$  de glicerol liberados/mg de proteína en 1 hora. En la figura aparecen las medias de 6 experimentos independientes, normalizadas *versus* la condición basal no estimulada (CTRL)(1,7  $\mu\text{moles}$  de glicerol/mg proteína). \*  $P \leq 0,05$ , \*  $P \leq 0,05$ ; probabilidad del test t-student respecto el grupo control basal. †  $P \leq 0,05$ ; probabilidad del test t-student respecto el grupo control estimulado por insulina.

## 1.5 Efecto de los tratamientos sobre la lipogénesis

El segundo efecto importante de la insulina sobre el metabolismo del adipocito que analizamos, que pudiera verse afectado por la desestructuración de las caveolas provocada por los tratamientos descritos, fue la estimulación de la lipogénesis por la insulina.

En este caso, la lipogénesis se midió como la cantidad (nmoles) de glucosa incorporada a lípido, mediante la incubación con [ $^{14}$ C]glucosa (ver apartado 5.3 de la sección Materiales y Métodos ) durante 1 hora y 30 minutos en presencia (ins) o ausencia (basal) de insulina 100nM, en adipocitos ayunados durante 2 horas, sin tratar (control) o tratados con las mismas drogas que en el apartado anterior.

En la figura 7 podemos ver como los tratamientos CD y MCD aumentan la lipogénesis basal 4 y 5 veces respectivamente y disminuyen un 40% la lipogénesis estimulada por insulina, de tal forma que provocan que prácticamente no haya estimulación de la lipogénesis por insulina.



**Figura 7. Medida de la lipogénesis basal y estimulada por insulina en adipocitos 3T3L1.** Los adipocitos 3T3L1 se incubaron en ausencia (CTRL) o en presencia de nistatina (Nist) 5 $\mu$ g/ml o filipina (Filip) 50 $\mu$ g/ml durante 15 minutos o bien con  $\beta$ -ciclodextrina 10mM (CD) o metil- $\beta$ -ciclodextrina 10mM (MCD) durante 50 minutos. Transcurrido este tiempo las células se incubaron 1 hora y 30 minutos en presencia de [ $^{14}$ C]Glucosa, con (barras grises; ins) o sin (barras negras; basal) insulina 100nM manteniendo los diferentes tratamientos. Se midió la lipogénesis realizada como los nmoles de glucosa incorporada a lípido en 1 hora y media. El valor medio de la lipogénesis basal en la condición control fue de 9,6 nmoles de glucosa/pozo de placa 6well. En la figura 7 aparecen las medias de 5 experimentos independientes, normalizadas *versus* la condición basal no estimulada (CTRL). \*  $P \leq 0,05$ , probabilidad del test t-student respecto el grupo control basal. †  $P \leq 0,05$  ; probabilidad del test t-student respecto el grupo control estimulado por insulina

## 2 Obtención de líneas 3T3L1 deficientes en caveolina-1 mediante silenciamiento génico posttranscripcional (*RNA interference*)

Las caveolas son un subtipo de *raft* lipídico (ver apartado 1.4 y 2 de la sección Introducción) que se forma por la oligomerización de la proteína caveolina-1 o caveolina-3. De hecho, está demostrado que la proteína caveolina es un componente estructural clave necesario para la biogénesis de las caveolas (Fra et al, 1995 y apartado 1.4 de la sección Introducción). En el tejido adiposo, y en la línea celular 3T3L1 concretamente, son especialmente abundantes los *rafts* lipídicos del tipo caveola, suponen un 30% de la superficie de la membrana plasmática (Fan *et al.*, 1983) y se expresan dos isoformas de caveolina: caveolina-1 y caveolina-2. Sin embargo, la estabilidad de caveolina-2 y su capacidad para alcanzar la membrana plasmática dependen de la presencia de caveolina-1 (Parton, 1996; Okamoto *et al.*, 1998). En la línea 3T3L1, un modelo celular ampliamente usado para estudiar adipogénesis, el número de caveolas y los niveles de RNA mensajero de caveolina-1 aumentan 10 y 20 veces, respectivamente, durante el proceso de diferenciación adipocitaria (Fan *et al.*, 1983; Scherer *et al.*, 1994).

Quisimos obtener líneas de 3T3L1 deficientes en caveolina-1 y estudiar en ellas tanto la estructura de los *rafts* lipídicos resultantes, como algunas de las funciones que se les han asignado a las caveolas (apartado 2.4 de la sección Introducción o revisión Liu *et al.*, 2002), y a las caveolinas, usando así un método específico para caveolas, a diferencia del uso de los tratamientos empleados en el capítulo 1 que unen y/o extraen el colesterol de las membranas y provocan, por tanto, cambios más severos en los *rafts* lipídicos (no son específicos de caveolas) y en la membrana plasmática en general.

Para disminuir la expresión de la caveolina-1 en estos adipocitos nos planteamos emplear la técnica de silenciamiento génico posttranscripcional, denominado *RNA interference*, mediante la introducción de las moléculas desencadenantes de este silenciamiento, los siRNA o moléculas de RNA de doble cadena homólogos a una parte de la secuencia del mRNA que queremos silenciar, en nuestro caso el de caveolina-1.

La introducción de estas moléculas siRNA en los adipocitos puede realizarse, directamente, mediante la transfección de las moléculas de RNA de doble cadena, mediante la transformación de vectores que expresen estos dúplex de RNA en la célula o mediante la transducción de vectores virales que de la misma manera, una vez en la célula expresen los siRNA. La introducción directa de las moléculas siRNA la descartamos, por un lado, debido al elevado coste económico que tiene la síntesis de estas moléculas y por otro, porque en nuestro grupo no hemos conseguido la transformación eficiente de adipocitos con material genético (por electroporación o mediante el uso de compuestos comerciales como *Fugene* o *Lipofectamina* de Invitrogen). Por esta razón, nos planteamos el uso de vectores virales que expresaran los siRNA en la célula y desencadenasen así el silenciamiento de caveolina-1, ya que la transducción usando partículas víricas es más eficiente que cualquier otro sistema de transformación en los adipocitos 3T3L1.

Como se explica en el apartado 2.1, previamente a la obtención de estas partículas víricas, quisimos comprobar la eficiencia de las moléculas de siRNA seleccionadas en un modelo fácilmente transformable, ya que en el momento de realizar estos experimentos, el proceso de generación de los vectores y partículas víricas que expresasen moléculas de siRNA no estaba puesto a punto en nuestro laboratorio. Así, generamos líneas estables de células HeLa que expresaban caveolina-1 y las transformamos con las moléculas de siRNA diseñadas. Tras la selección de las secuencias de siRNA más eficientes procedimos a la clonación de los vectores víricos, y la puesta a punto de la transducción de adipocitos 3T3L1 con partículas lentivirales.

## 2.1 Selección de las secuencias de *small interference* RNA (siRNA) para la Caveolina-1 murina mediante el ensayo de silenciamiento génico posttranscripcional en células HeLa que expresan de forma estable caveolina-1

El ensayo de silenciamiento génico posttranscripcional conocido como *RNA interference*, brevemente, consiste en la introducción de moléculas de 19-21 nucleótidos de RNA de doble cadena (siRNA) complementarios (una de las cadenas) a la secuencia del RNA mensajero (mRNA) diana que queremos silenciar en la célula destino. De esta manera, se inicia un mecanismo enzimático que lleva a la degradación específica y transitoria del mRNA diana. En principio, cualquier molécula de RNA de doble cadena de entre 19 y 21 nucleótidos complementaria al mRNA endógeno debería ser altamente eficiente en el proceso de degradación del mRNA y consecuente “silenciamiento” de la proteína. Sin embargo, está demostrado que las propiedades termodinámicas de los oligonucleótidos y de la secuencia complementaria del mRNA diana son clave para la eficiencia de este silenciamiento. (Reynolds et al., 2004).

<b>CRITERIOS BIOFÍSICOS/ TERMODINÁMICOS</b>
1. Porcentaje G+C bajo (30-50%)
2. Baja estabilidad del extremo 5' en la cadena <i>antisense</i>
3. Alta estabilidad en el extremo 5' de la cadena <i>sense</i>
4. Ausencia de palíndromos o secuencias repetitivas
5. Predicción de formación de hélice entre el oligonucleótido y la secuencia diana
<b>CRITERIOS DE SECUENCIA</b>
6. Presencia de A en posición 3 y 19 de la cadena <i>antisense</i>
7. Ausencia de G o C en la posición 19 de la cadena <i>antisense</i>
8. Presencia de U en posición 10
9 Ausencia de G en posición 13 de la cadena <i>antisense</i>
<b>POTENCIAR LA ESPECIFICIDAD</b>
10. Evitar la homología de la secuencia del oligonucleótido con otros genes (BLAST)

**Tabla A.** Criterios para el diseño racional de los siRNA. Adaptado de (Reynolds *et al.*, 2004).

Para la selección de los siRNA se usó el programa informático de Ambion ([http://ambion.com/techlib/misc/siRNA\\_design.html](http://ambion.com/techlib/misc/siRNA_design.html)) que tiene en cuenta algunos criterios de secuencia y termodinámicos para favorecer un silenciamiento eficiente del mRNA diana que en este caso fue el de caveolina-1 (NM\_007616, secuencia del transcrito de caveolina-1 de *mus musculus*).

Las secuencias escogidas a partir de las cuales se generaron los siRNA de doble cadena fueron

siRNA1: del nucleótido 164 al 182 (GTCTGCCATGGCCTTGTTG)

siRNA2 del nucleótido 221 al 240 (GTTGACCAGGTCAATCTCC)

siRNA3 del nucleótido 309 al 327 (CGTCGAACTGTGTGTCCC)

siRNA4 del nucleótido 575 al 593 (GCGGATGTTGCTGAATATC)

siRNA5 del nucleótido 1047 al 1065(GAGGACAGCAACCAATTCC)



Estas secuencias y sus complementarias fueron transcritas *in vitro* y anilladas en forma de RNA de doble cadena mediante el “*silencer siRNA construction Kit*” de Ambion, tal y como se explica en el apartado 2.2 de la sección Materiales y Métodos.

Para comprobar la eficiencia de los siRNA era necesario introducir estas moléculas de RNA de doble cadena en células que expresaran caveolina-1. No se realizó directamente sobre los adipocitos 3T3L1 porque este modelo celular tiene una muy baja eficiencia de captación de nucleótidos, y aunque la electroporación es un método de transformación ampliamente extendido para los adipocitos 3T3L1 (Parpal *et al.*, 2001; Shigematsu *et al.*, 2003), en nuestro laboratorio no lo hemos conseguido poner a punto de manera eficaz, consiguiendo entre un 10 y un 30% de eficiencia en la electroporación.

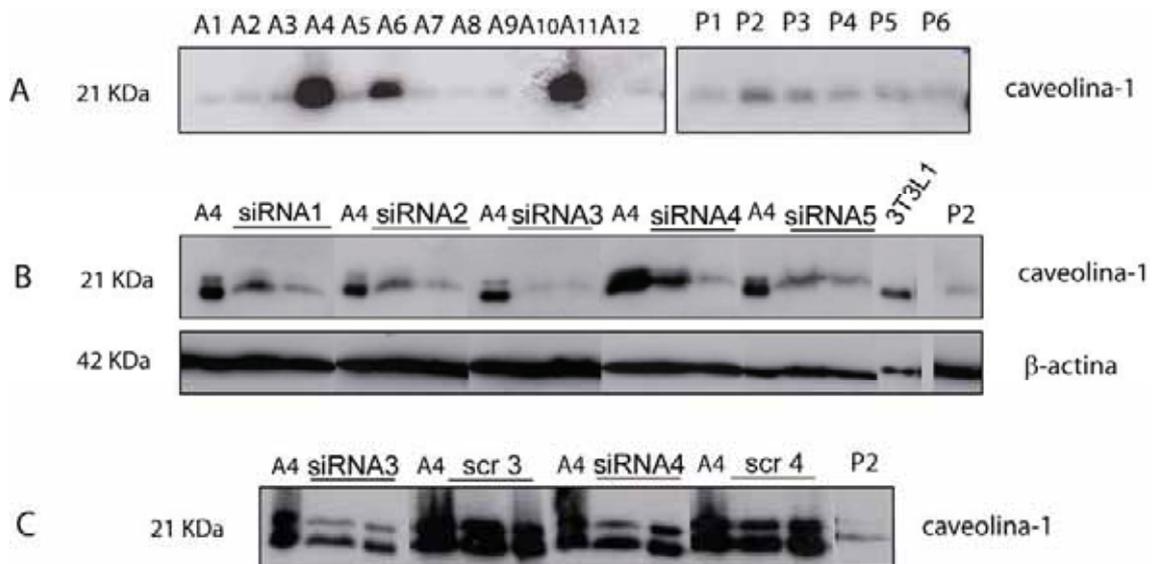
Nos propusimos entonces generar unas líneas de células HeLa que expresaran de forma estable caveolina-1 murina (cuya secuencia fue clonada en el vector pCDNA3 de Invitrogen)(ver Apéndice III de la sección Materiales y Métodos)(figura 8A) que posteriormente transfectamos con los siRNAs seleccionados, a una concentración de 50nM (usando el protocolo de transfección de Lipofectamina2000<sup>®</sup> de Invitrogen)(figura 8B) La eficiencia de silenciamiento de los distintos oligonucleótidos fue valorada por Western blot usando el anticuerpo anti-caveolina-1 de Transduction Laboratorios (que reconoce las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  de la caveolina-1), 72 horas después de la transfección. Además, como controles de expresión de caveolina-1 analizamos también los lisados de adipocitos 3T3L1 y de la línea estable P2 de células HeLa (contiene el vector pcDNA3 vacío). Como se observa en la figura 8B, todos los siRNA conseguían disminuir la expresión de caveolina-1.

Generamos entonces, de la misma manera que los siRNA anteriores, los siRNA *scramble* de dos de los siRNA, el 3 y el 4 (scr 3 y scr 4), que tienen una composición nucleotídica idéntica a la de siRNA de partida pero con distinta secuencia de tal manera que no son homólogos al mRNA de caveolina-1 de la célula (ni tampoco tienen homología de secuencia con ningún otro gen de *mus musculus*) y por tanto no provocan el “silenciamiento” de caveolina-1.

Secuencia scr 3: 5'- ATTGCTTACCGACGCCCTG -3'

Secuencia scr 4: 5'- CTATCGGAATTGATCCCTG -3'

Como se observa en la figura 8C, la transfección con las secuencias *scramble* de los siRNA 3 y 4 no afectó a la expresión de caveolina-1.



**Figura 8. Efecto de los siRNA de caveolina-1 seleccionados (siRNA1-siRNA5) sobre la expresión de la proteína en líneas de células HeLa que sobreexpresan de forma estable caveolina-1 murina.** (A) Análisis de la expresión de la proteína caveolina-1 mediante western blot en líneas estables de células HeLa obtenidas mediante la transfección del vector pcDNA3 (líneas P1-P6) o del cDNA de caveolina-1 murino clonado en el vector pcDNA3 (líneas A1-A12) (ver apartado 1.10 de la sección Materiales y Métodos). (B) La línea estable de células HeLa A4 fue transfectada con 50nM de cada uno de los siRNA de doble cadena seleccionados (siRNA1-siRNA5) usando Lipofectamina2000 de Invitrogen (ver apartado 1.9.4 de la sección Materiales y Métodos). 72 horas después de la transfección, las células fueron lisadas y 15  $\mu$ g de proteína de los homogenados resultantes fueron analizados por western blot usando los anticuerpos anti-caveolina-1 y anti- $\beta$ -actina. También se usaron lisados de adipocitos 3T3L1 y de la línea estable de células HeLa P2 sin transfectar. (C) De la misma manera que en el apartado B, la línea de células HeLa A4 fue transfectada con 50nM de los siRNA 3 y 4, o con sus secuencias *scramble* (scr3 y scr4) que son de nuevo siRNA de doble cadena con una composición nucleotídica idéntica al siRNA de partida pero con distinta secuencia (desordenados). 72 horas después de la transfección los lisados fueron analizados por western blot usando un anticuerpo anti-caveolina-1.

Tras estas primeras pruebas de la eficiencia del silenciamiento génico de los siRNA seleccionados, continuamos diseñando nuevos siRNA para tratar de optimizar su eficiencia, atendiendo a más criterios termodinámicos de los oligonucleótidos gracias al programa que facilita la dirección <http://ozone2.chem.wayne.edu> y a la colaboración del Dr. Daniel Bach de la "Ecole Polytechnique Fédérale de Lausann" en Suiza. Así, diseñamos el:

siRNA3P que se generó optimizando la secuencia del siRNA3 del apartado anterior y que corresponde a los nucleótidos 301-319 del cDNA de caveolina-1 (NM\_007616) (AACCAGAAGGGACACACAG)

siRNA6: del nucleótido 526 al 544 (CCTCTACGTCACATACCTT)

siRNA7: del nucleótido 349 al 367 (CCACCTTCACTGTGACAAA)

siRNA8: del nucleótido 1820 al 1838 (TGACCTAATCCAACCATCA)

## 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

Debido a la dificultad que presenta la transferencia de material genético a los adipocitos 3T3L1, nos planteamos la introducción de las secuencias de los siRNA seleccionados mediante la transducción usando vectores virales.

En el momento de iniciar estos experimentos se publicó el uso de vectores lentivirales derivados del HIV-1 para la transferencia de material genético de manera muy eficiente a adipocitos y preadipocitos 3T3L1 sin que aparecieran signos de toxicidad o citopatogenicidad en los cultivos (Carlotti et al., 2004).

Los vectores lentivirales pueden mediar de manera eficiente la entrada, integración y expresión estable de transgenes o de secuencias que generen tras su transcripción, las moléculas de siRNA en la célula, tanto en células en división como quiescentes.

Las partículas lentivirales se generan mediante la coexpresión de elementos de empaquetamiento del virión y el genoma del vector en una célula usada como "productora", normalmente la línea celular Hek293T.

En los vectores basados en HIV-1, el *core* y los componentes enzimáticos proceden del HIV-1, mientras que la cápsula o *envelope* deriva de un virus heterólogo, normalmente es *vesicular stomatitis virus* (VSV) debido a su elevada estabilidad y al amplio tropismo de su proteína G. Por convenio, se denomina a los elementos enzimáticos (que proceden del HIV-1) como sistema de empaquetamiento LV (*LV packaging system*) y al otro elemento se le llama *envelope*.

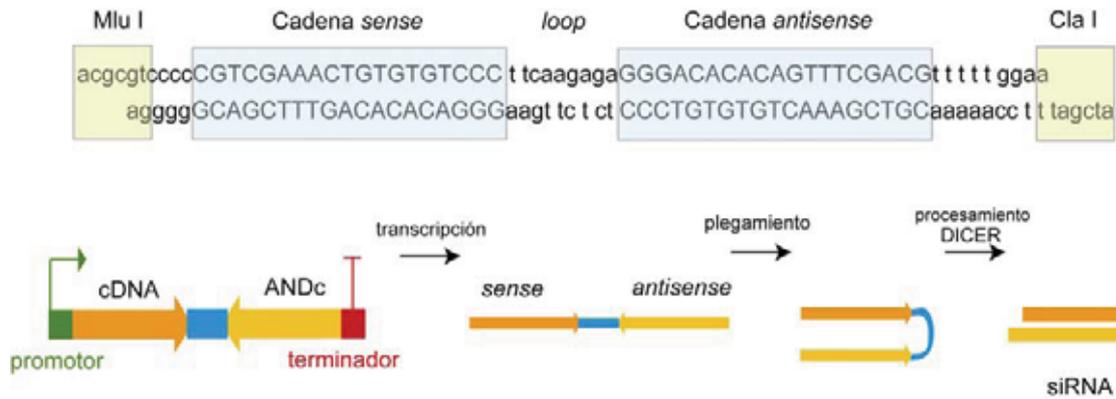
Por tanto, para producir los lentivectores se necesitan 3 componentes:

- El vector lentiviral: donde hemos de clonar el transgen o la secuencia que genere el siRNA (en nuestro caso se llama pLVHM y fue cedido por el Dr. Didier Trono de "Ecole Polytechnique Fédérale de Lausann" en Suiza). Este vector contiene la secuencia para expresar la *green fluorescen protein* (GFP) bajo el promotor, EF 1 alpha, además del promotor H1 de la polimerasa III para expresar los siRNA, de manera que cuando se integra en el genoma, expresa tanto la proteína GFP como los siRNA que silenciaran, en nuestro caso, la proteína caveolina-1.

- *Packaging system*: el vector pCMVdR8.74
- Elemento *envelope*: el vector pMD2G

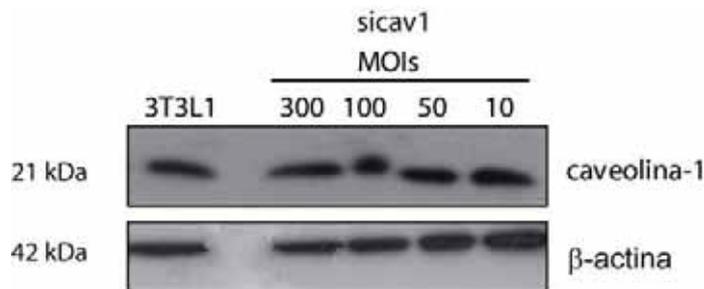
Para clonar las secuencias que dan lugar a los siRNA en las células transducidas, se procedió como se indica en los apartados 2.1 y 2.4 de la sección Materiales y Métodos.

Brevemente, se diseñaron oligonucleótidos (como el del esquema inferior, que corresponde a la secuencia de siRNA3) que contienen las secuencias *sense* y *antisense* del siRNA separadas por una secuencia (*loop*) que cuando se transcribe a RNA genera un bucle que permite el plegamiento de la molécula de RNA y la generación de un RNA de doble cadena, éste será procesado por la célula (complejo enzimático DICER) para dar los siRNA.



La producción de las partículas lentivirales se llevó a cabo en células Hek293T como se explica en el apartado 3.1 de la sección Materiales y Métodos. Se consiguió llegar a un título de  $10^{8-9}$  unidades infectivas/ml. El título se calculó mediante el análisis por citometría de flujo (FACS) del porcentaje de células Hek293T que expresan GFP, como se explica en el apartado 3.2 de la sección Materiales y Métodos.

En primer lugar nos planteamos la infección de adipocitos 3T3L1 maduros con estas partículas lentivirales que codifican tanto la proteína GFP como los siRNA, con la intención de disminuir la expresión de caveolina-1. Para ello se probaron distintas multiplicidades de infección (MOIs, que indica el número de unidades infectivas necesarias para transducir una célula diana) basándonos en lo que estaba descrito en la bibliografía (Carlotti *et al.*, 2004; Katayama *et al.*, 2004). Se probaron 10, 50, 100 y 300 MOIs, y en ningún caso se consiguió disminuir los niveles de expresión de la proteína caveolina-1 de los adipocitos. Sin embargo, cuando analizábamos el porcentaje de células que contenían la proteína GFP (y que por tanto habían sido transducidas) mediante el uso de la metodología FACS (*fluorescence activated cell sorting*), observamos que tan sólo entre un 20 y un 30% de ellas habían integrado el vector lentiviral.



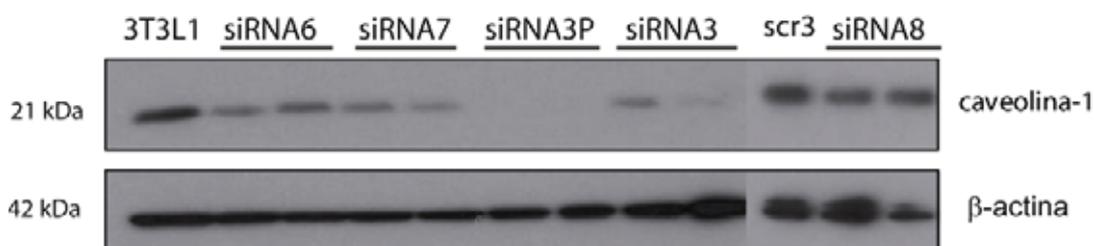
**Figura 9. Análisis de la expresión de caveolina-1 en adipocitos 3T3L1 infectados con diferentes MOIs de partículas lentivirales que codifican la secuencia del siRNA3P.** Los adipocitos 3T3L1 maduros crecidos en pozos de placas 6well, fueron infectados como se explica en los Materiales y Métodos con distintas MOIs de lentivirus, tras 5 días, las células se tripsinizaron y resuspendieron en 1ml de medio DMEN, un 10% del volumen se usó para calcular el porcentaje de infección mediante el FACS. El resto, se centrifugó y se lisó en un tampón que contenía Igepal 1%. Con los homogenados celulares se realizó western blot usando los anticuerpos anti-caveolina-1 y anti  $\beta$ -actina.

Sin embargo, cuando realizamos infecciones con otros vectores lentivirales que construimos para la expresión de proteínas recombinantes como caveolina-1-YFP (*yellow fluorescen protein*) o GLUT4-GFP (*green fluorescen protein*), el porcentaje de infección era mucho mayor (casi el 100% de las células expresaban estas proteínas recombinantes)(ver

anexo de esta tesis). Por tanto, habíamos conseguimos infectar adipocitos maduros y expresar en ellos transgenes, pero cuando usábamos las partículas lentivirales que codifican los siRNA esta eficiencia disminuía considerablemente. Esta diferencia entre la eficiencia de transducción con los distintos vectores fue corroborada por el Dr. Daniel Bach de la "Ecole Polytechnique Fédérale de Lausann" en Suiza, cuyo grupo había desarrollado estos vectores lentivirales, aunque hasta el momento no se ha analizado la razón de esta diferencia.

Al no conseguir un elevado porcentaje de infección en los adipocitos maduros, nos planteamos realizar la transducción en preadipocitos 3T3L1 (fibroblastos predeterminados a la diferenciación adipocitaria), en los cuales la transferencia de material genético es en general más eficiente (datos obtenidos por la Dra. Anna Ros de nuestro grupo mostraban que la transfección es más eficiente en los preadipocitos que en los adipocitos maduros usando la técnica de electroporación de DNA plasmídico, o usando el reactivo Lipofectamina2000® de Invitrogen).

Para infectar los preadipocitos 3T3L1, lo primero que hicimos fue usar una multiplicidad de infección alta (600 MOI, es decir, 600 unidades infectivas, tituladas en células Hek293T, por cada fibroblasto 3T3L1 sembrado), de manera que nos aseguramos la infección de prácticamente todas las células (aproximadamente el 100% de las células expresaban GFP, cuantificado por citometría de flujo), para seleccionar así los siRNA que usaríamos para poner a punto el protocolo de líneas estables de preadipocitos deficientes en caveolina-1.

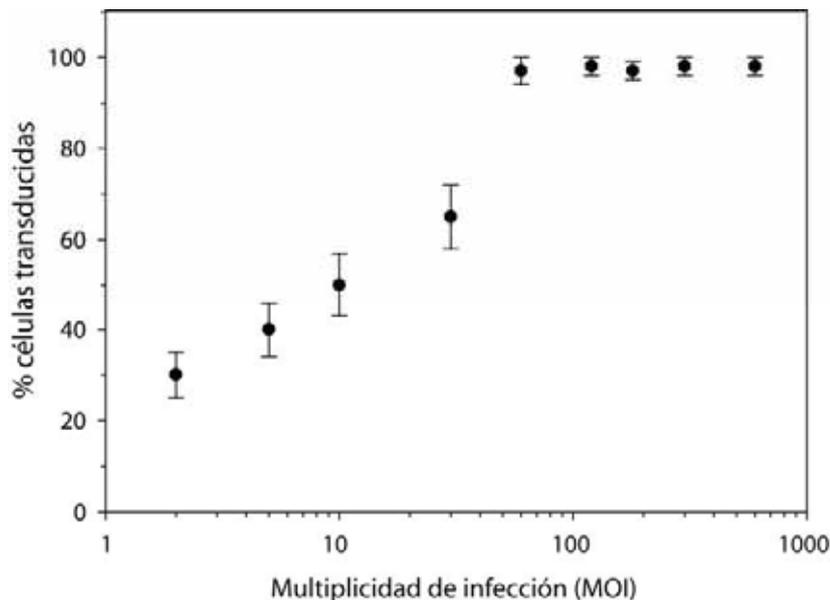


**Figura 10. Expresión de caveolina-1 en preadipocitos 3T3L1 transducidos con lentivirus que generan los siRNA 3, 3P, 6, 7, 8 y scramble3**. 30000 células fueron sembradas en pozos de placas 6well y transducidas con los lentivirus descritos en este apartado (siRNA3, 3P, 6, 7, 8 y scr3), con una multiplicidad infectiva de 600MOI. 5 días después de la infección, las células se tripsinizaron y resuspendieron en 1ml de medio DMEN, un 10% del volumen se usó para calcular el porcentaje de infección mediante citometría de flujo. El resto, se centrifugó y se lisó en un tampón que contenía igepal 1%. Con los homogenados celulares se realizó western blot usando los anticuerpos anti-caveolina-1 y anti  $\beta$ -actina

Habíamos por tanto conseguido transducir eficientemente preadipocitos 3T3L1 con las partículas lentivirales que expresaban tanto GFP como los siRNA seleccionados. Como se muestra en la figura 10, logramos disminuir la expresión de caveolina-1 en los preadipocitos 3T3L1 con 4 de los 5 siRNA que probamos en esta ocasión, sin embargo, el siRNA3P resultó ser el más eficiente en el "silenciamiento" de la proteína caveolina-1. A partir de ahora, el siRNA3P y el siRNA *scramble3* (scr3) serán los que usaremos para generar las líneas estables de preadipocitos 3T3L1 control y deficientes en caveolina-1, y las llamaré siRNA *scramble* (scr) y siRNA de caveolina-1 (sicav1), respectivamente.

### 2.3 Generación de líneas estables de preadipocitos 3T3L1 deficientes en caveolina-1 y su posterior diferenciación a adipocitos

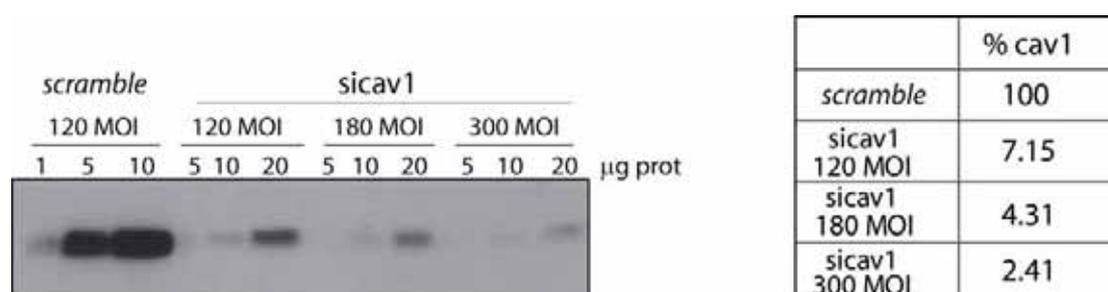
Para infectar los preadipocitos 3T3L1, de nuevo probamos diferentes multiplicidades de infección (MOIs): 2, 5, 10, 30, 60, 120, 180, 300 y 600 (usando los vectores lentivirales que codifican el siRNA de caveolina-1 y el *scramble*) y comprobamos (como antes, mediante citometría de flujo, el porcentaje de células que expresaban GFP) que ya con 30 MOI conseguíamos un elevado porcentaje de infección (alrededor de un 60%)



**Figura 11. Porcentaje de transducción de preadipocitos 3T3L1 tras la infección** con diferentes multiplicidades de infección usando partículas lentivirales que codifican el siRNA de caveolina-1 y el *scramble*. 10.000 células se sembraron en pozos de placas 6well y fueron transducidas con los lentivirus sicav1 y scr usando distintas multiplicidades infectivas (de 2 a 600MOI). 5 días después de la infección, las células se tripsinizaron y resuspendieron en 1ml de medio DMEM, y se calculó el porcentaje de infección cuantificando el porcentaje de células que expresan GFP mediante citometría de flujo.

Cada población de preadipocitos 3T3L1 transducidos con las partículas víricas a las diferentes multiplicidades infectivas que codifican la proteína GFP y el siRNA de caveolina-1 (sicav1) o el siRNA *scramble* (scr), fue sometida a la metodología del FACS (*fluorescence activated cell sorting*) que permite separar las células transducidas (y que por tanto expresan GFP) de las que no lo están (no expresan GFP). Se seleccionaron las células transducidas, y que además tuvieran una intensidad de emisión de la frecuencia a la que emite la proteína GFP similar. Esta intensidad depende de la cantidad de copias del gen *gfp* integradas en el genoma, y por tanto se relaciona con el número de partículas víricas integradas. Obtuvimos así, una población de preadipocitos 100% transducidos lo más homogénea posible en cuanto a expresión de GFP (relacionada con el número de integraciones del virus en el genoma).

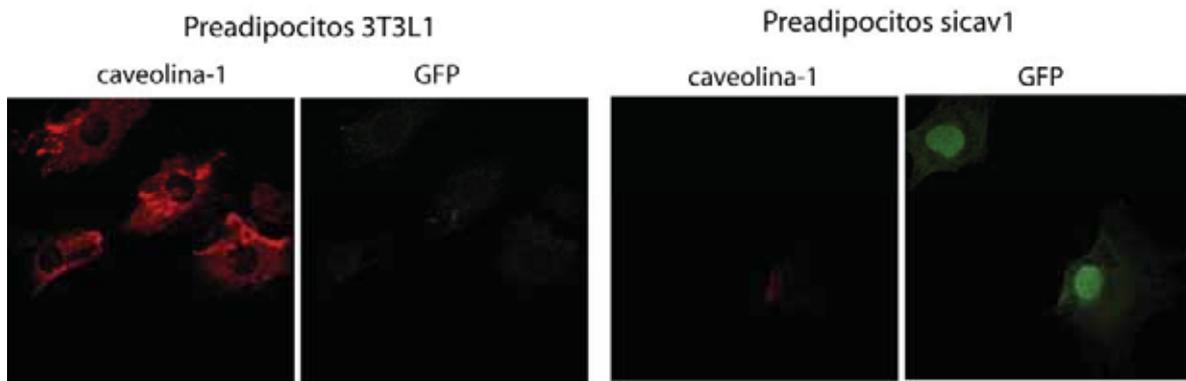
Para comprobar, antes de continuar con el proceso de diferenciación de estos preadipocitos a adipocitos maduros, que efectivamente estábamos disminuyendo la expresión de la proteína caveolina-1, realizamos un western blot cargando cantidades crecientes del homogenado celular (1-20 $\mu$ g de proteína), usando el anticuerpo anti-caveolina-1, de los fibroblastos infectados con algunas de las multiplicidades de infección, (120, 180 y 300 MOI) (figura 12). Como se muestra en la tabla de la figura 12, mediante la posterior densitometría de las bandas obtenidas, estimamos el porcentaje de caveolina-1 presente en cada uno de los homogenados de los distintos grupos de preadipocitos infectados, respecto a la cantidad de caveolina-1 presente en los preadipocitos *scramble* (es decir, los generados tras la infección con los lentivirus que expresan el siRNA *scramble*). En todos los casos, conseguimos disminuir la expresión de la caveolina-1 más de un 90%.



**Figura 12. Expresión de caveolina-1 en preadipocitos 3T3L1 transducidos con lentivirus que codifican los siRNA de caveolina-1 (*sicav1*) y *scramble*.** Preadipocitos 3T3L1 infectados con distintas multiplicidades infectivas (120, 180 y 300 MOI) de las partículas lentivirales *sicav1* y *scramble*, fueron seleccionados mediante la técnica del FACS como se describe en este apartado. Se sembraron en placas de 10cm de diámetro y se lisaron en tampón A-Igepal1%. Se cuantificaron las proteínas de los homogenados de cada grupo de células (método colorimétrico *Pierce*) y se cargaron cantidades crecientes de proteína (en  $\mu$ g) para realizar SDS-PAGE. La expresión de la proteína caveolina-1 se valoró mediante western blot usando un anticuerpo anti-caveolina-1. El valor obtenido de la densitometría de cada una de las bandas obtenidas se relacionó con la cantidad de proteína de la que se partió y así se estimó la cantidad de caveolina 1 presente en cada uno de los lisados. En la tabla se muestra el porcentaje de caveolina-1 presente en cada homogenado respecto a las células infectadas con lentivirus *scramble*.

La disminución de expresión de la proteína caveolina-1 también se ponía de manifiesto cuando realizamos una inmunolocalización de caveolina-1 en los preadipocitos 3T3L1 sin infectar o infectados con 120 MOI del lentivirus *sicav1*, usando el anticuerpo anti-caveolina-1 y el anticuerpo secundario *donkey anti-rabbit* conjugado al fluorocromo AlexaFluor568 (figura 13).

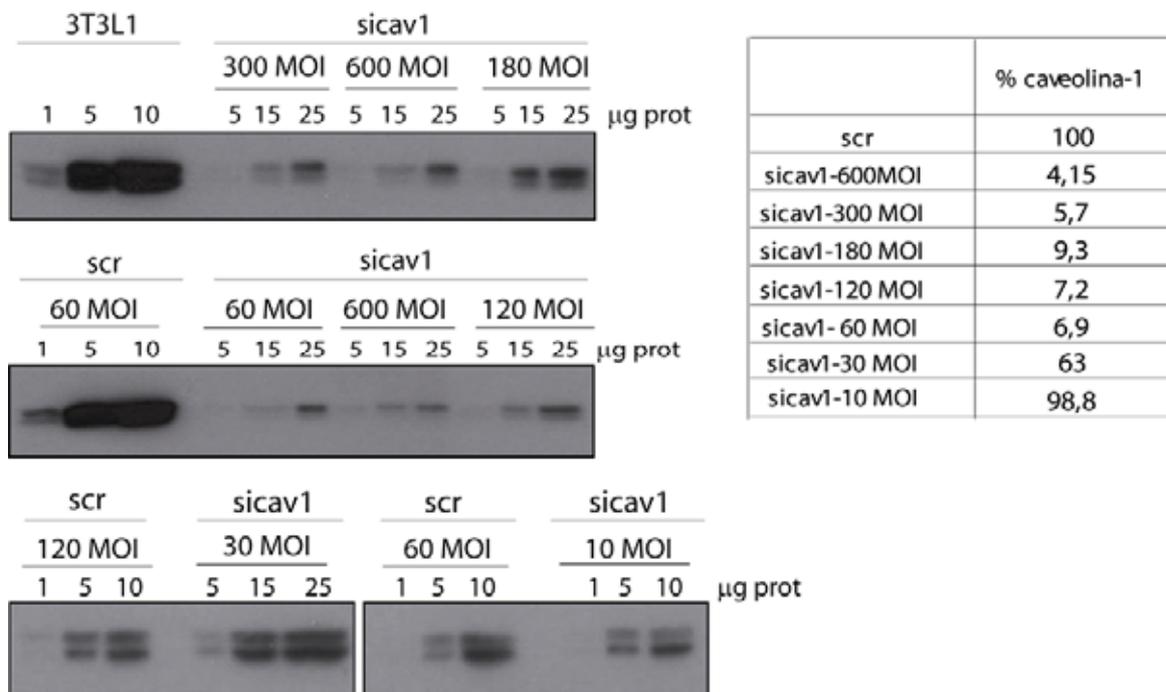
Una vez comprobado que disminuíamos la expresión de caveolina-1 en el rango de multiplicidades infectivas que estábamos usando, procedimos a diferenciar las diferentes líneas de preadipocitos 3T3L1 generadas tras la infección con el siRNA de caveolina-1 y *scramble* y la posterior selección mediante la metodología del FACS descrita en este mismo apartado. La diferenciación se llevó a cabo tal y como se describe en el apartado 1.8 de la sección Materiales y Métodos.



**Figura 13.** Inmunolocalización de caveolina-1 en preadipocitos 3T3L1 sin infectar (3T3L1) o infectados con 120 MOI del lentivirus sicav1. Los preadipocitos crecidos en cubreobjetos fueron fijados y sometidos a inmunofluorescencia usando el anticuerpo anti-caveolina-1 y el anticuerpo secundario donkey anti-rabbit conjugado al fluorocromo AlexaFluor568. La expresión de caveolina-1 y de GFP se analizó por microscopía de fluorescencia confocal. En rojo aparece el marcaje de caveolina-1 y en verde el de GFP. Las imágenes son representativas de 3 experimentos y fueron captadas en las mismas condiciones, por lo que las intensidades de los píxeles pueden ser directamente comparadas.

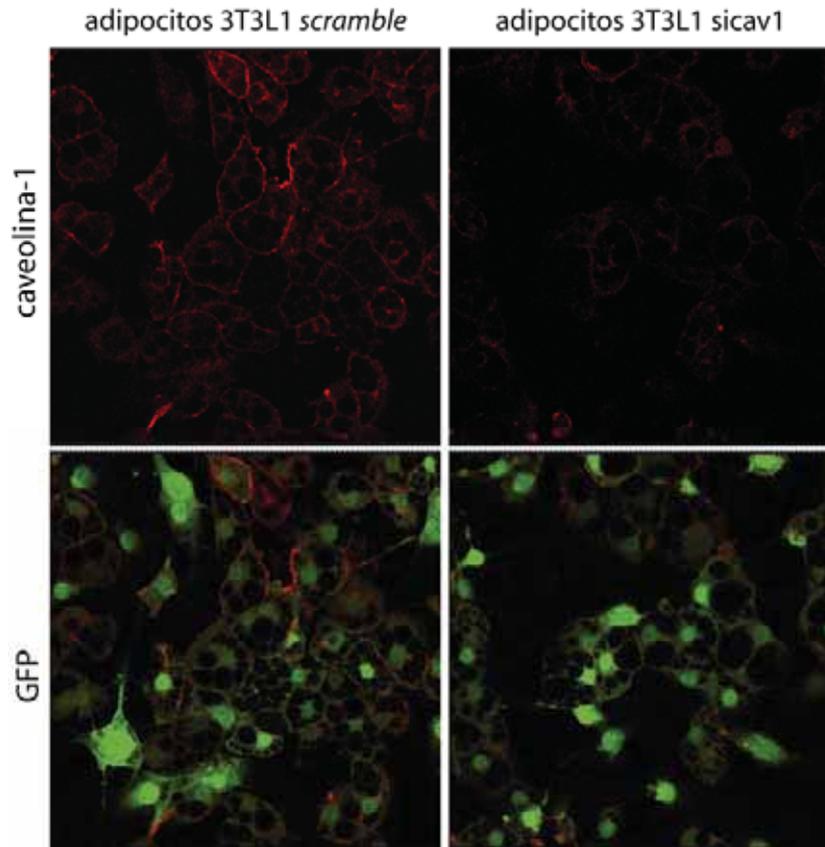
Para comprobar la eficiencia del siRNA de caveolina-1 disminuyendo la expresión de esta proteína en los adipocitos maduros, realizamos un SDS-PAGE y posterior western blot usando el anticuerpo anti-caveolina-1 (figura 14), cargando de nuevo, cantidades (en  $\mu\text{g}$ ) crecientes de proteína presente en los homogenados, obtenidos tras lisar los adipocitos que llamaremos *scramble* y *sicav1*, refiriéndonos a que fueron obtenidos tal y como se describe este apartado a partir de la transducción de las partículas lentivirales que expresan el siRNA de caveolina-1 y el siRNA *scramble* cuando se integran en el genoma de la célula. En este caso añadimos además el grupo de adipocitos 3T3L1 sin infectar para comprobar que la expresión de caveolina-1 era similar a la de los adipocitos *scramble*.

Como antes, tras realizar la densitometría de las bandas obtenidas en el western blot (figura 14) se relacionó el valor obtenido con la cantidad de proteína del homogenado del que procede, y así se estimó el porcentaje de caveolina-1 presente en cada grupo de adipocitos *sicav1* respecto a la que expresan los adipocitos *scramble*. Observamos en la tabla de la figura 14, que en los adipocitos *sicav1* infectados con las multiplicidades infectivas 60, 120, 180, 300 y 600 MOI, se consiguió disminuir la expresión de caveolina-1 en torno a un 95%. Recordemos que usando estas multiplicidades infectivas habíamos conseguido transducir prácticamente el 100% de los preadipocitos sembrados (figura 11). En cambio, en los adipocitos generados usando 30 y 10 MOI, la disminución de la expresión de caveolina-1 fue mucho menor, un 45% y apenas un 3% respectivamente.

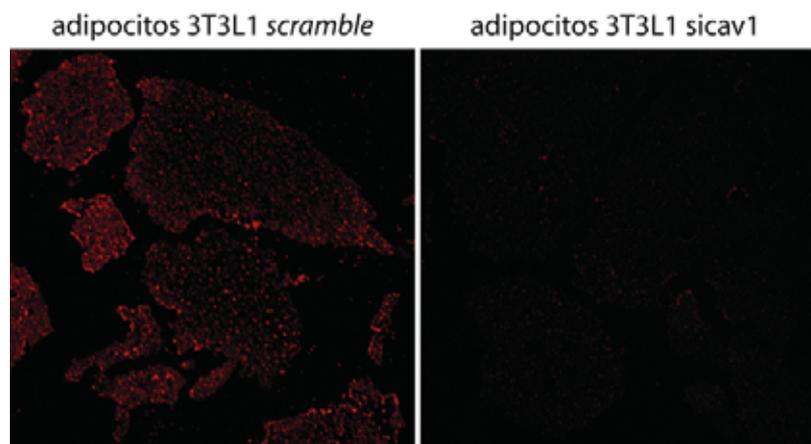


**Figura 14. Expresión de caveolina-1 en adipocitos 3T3L1 maduros procedentes de los preadipocitos transducidos con lentivirus sicav1 y scramble (scr) usando diferentes multiplicidades de infección (MOI).** Los distintos grupos de adipocitos, sin infectar (3T3L1) e infectados con distintas MOI de lentivirus sicav1 y *scramble*, sembrados en placas de 10 cm de Ø fueron lisados usando el tampón A-Igepal1% (ver métodos). Se cuantificaron las proteínas de los homogenados de cada grupo de células (método colorimétrico *Pierce*) y se cargaron cantidades crecientes de proteína para realizar el SDS-PAGE. La expresión de la proteína caveolina-1 se analizó mediante western blot usando un anticuerpo anti-caveolina-1. El valor obtenido de la densitometría de cada una de las bandas obtenidas se relacionó con la cantidad de proteína de la que se partió y así se estimó la cantidad de caveolina-1 presente en cada uno de los lisados. En la tabla se muestra el porcentaje de caveolina-1 presente en cada homogenado respecto a las células infectadas con lentivirus scr.

Como en el caso de los preadipocitos, también quisimos comprobar la disminución de expresión de la proteína caveolina-1 mediante una inmunolocalización de caveolina-1 en los adipocitos 3T3L1 *scramble* y sicav1, usando el anticuerpo anti-caveolina-1 y el anticuerpo secundario *donkey anti-rabbit* conjugado al fluorocromo AlexaFluor568 (figura15). Sin embargo, aunque se observa menor intensidad en el marcaje de caveolina-1 en los adipocitos sicav1, esta disminución no parece tan drástica como cuando la estudiamos por western blot. Cuando realizamos la inmunofluorescencia para detectar caveolina-1 sobre fragmentos de membrana plasmática (figura16) se observa más claramente la disminución de la expresión de esta proteína.



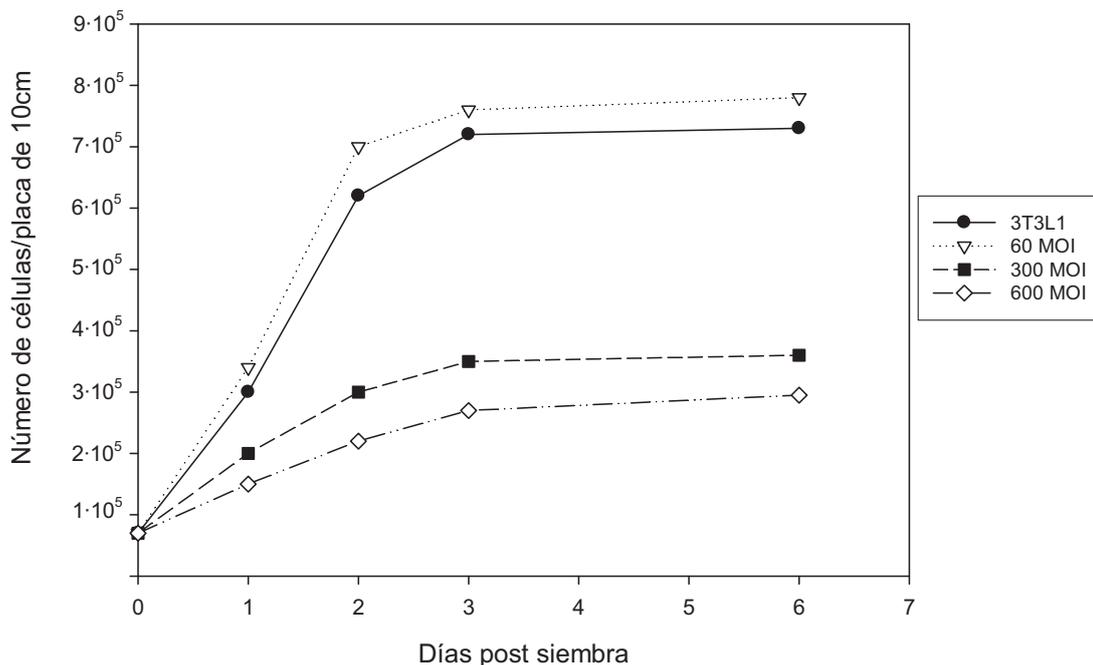
**Figura 15. Inmunolocalización de caveolina-1 en adipocitos 3T3L1 infectados con 60 MOI del lentivirus *scramble* o *sicav1*.** Los adipocitos crecidos en cubreobjetos fueron fijados y sometidos a inmunofluorescencia usando el anticuerpo anti-caveolina-1 y el anticuerpo secundario anti-rabbit conjugado al fluorocromo AlexaFluor468. La expresión de caveolina-1 y de GFP se analizó por microscopía de fluorescencia confocal. En rojo aparece el marcaje de caveolina-1 y en verde el de GFP. Las imágenes son representativas de 3 experimentos y fueron captadas en las mismas condiciones, por lo que las intensidades de los píxeles pueden ser directamente comparadas.



**Figura 16. Inmunolocalización de caveolina-1 sobre fragmentos de membrana plasmática de adipocitos 3T3L1 *scramble* y *sicav1*.** Se realizó una inmunofluorescencia usando un anticuerpo anti-caveolina-1 y un anticuerpo secundario conjugado al fluorocromo AlexaFluor-568, sobre fragmentos de membrana plasmática (apartado 4.1 de la sección Materiales y Métodos) obtenidos a partir de adipocitos 3T3L1 *scramble* o *sicav-1* crecidos en cubreobjetos.

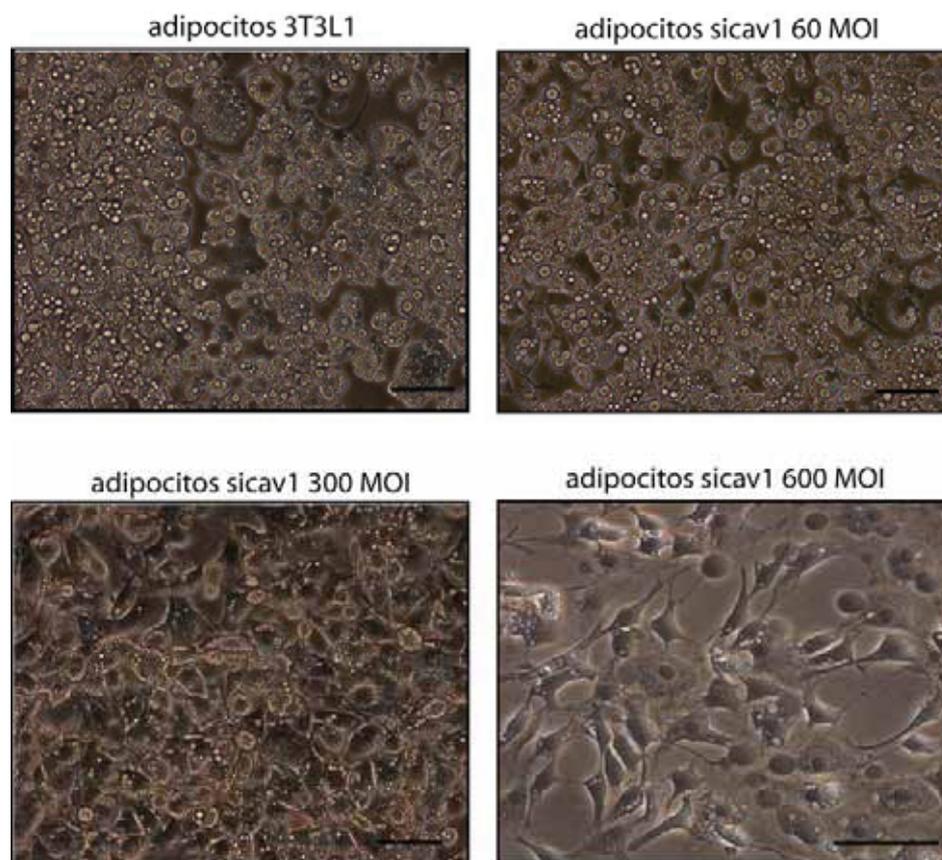
Durante la generación de estas líneas de preadipocitos deficientes en caveolina-1 habíamos observado que las células que habían sido infectadas con mayor cantidad de unidades infectivas (300 y 600 MOI) presentaban un comportamiento diferente al resto en dos aspectos fundamentales: la velocidad de crecimiento y la capacidad de diferenciación a adipocitos.

Como se muestra en la figura 17, los preadipocitos sicav1 infectados con 300 y 600 MOI presentaban menor velocidad de crecimiento y menor número de células cuando alcanzan el estado estacionario de crecimiento, que los adipocitos 3T3L1 sin infectar y los infectados con 60 MOI.



**Figura 17. Crecimiento de las distintas líneas de preadipocitos 3T3L1.** Las distintas líneas de fibroblastos sin infectar (3T3L1) y las generadas tras infectar con las distintas MOI de lentivirus sicav1, se sembraron en 4 placas de 10 cm de diámetro (70000 células/placa). Los días 1, 2, 3 y 6 postsiembra, las células se recogieron, se fijaron con paraformaldehído, se marcó su DNA con yoduro de propidio (como se indica en apartado 1.11 de la sección Materiales y Métodos) y se contaron mediante citometría de flujo.

Además, como se muestra en las imágenes de microscopio en campo claro de la figura 18, la diferenciación de los preadipocitos sicav1 infectados con 300 MOI generaba unos adipocitos con menos cantidad de gotas lipídicas (LDs) que aparecían rodeados de gran cantidad de fibroblastos sin diferenciar. Cuando aumentamos la multiplicidad infectiva a 600 MOI, los preadipocitos eran incapaces de diferenciar, no adquirían la forma redondeada característica de adipocitos, ni acumulaban LDs.



**Figura 18. Imágenes de microscopio en campo claro de los adipocitos 3T3L1 después de 7 días de comenzar la diferenciación**. Las distintas líneas de fibroblastos sin infectar (3T3L1) y las generadas tras infectar con las distintas MOI de lentivirus sicav1, se diferenciaron como se indica en el apartado 1.8 de la sección Materiales y Métodos). Tras 7 días de comenzar la diferenciación, se tomaron imágenes en campo claro en un microscopio invertido, para observar la morfología y acúmulo de gotas lipídicas. Escala: 80 $\mu$ m

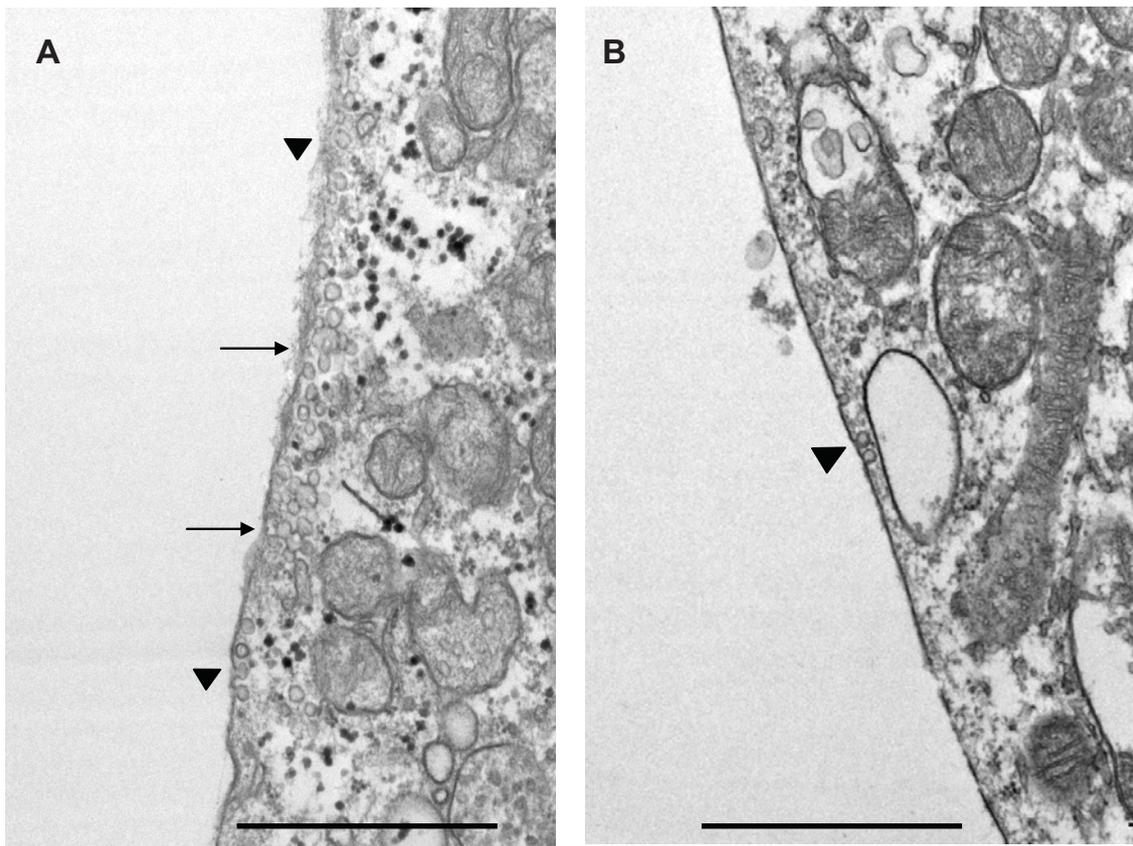
Para comprobar que el fenotipo observado en los preadipocitos se debe a la disminución de expresión de caveolina-1 y no a un número demasiado elevado de partículas víricas integradas en su genoma, decidimos usar a partir de ahora los preadipocitos (y adipocitos) generados usando la mínima multiplicidad infectiva necesaria para provocar la mayor disminución de caveolina-1, que fue de 60 MOI. En paralelo, y como células control siempre usaremos los preadipocitos y adipocitos 3T3L1 generados también usando 60 MOI de los lentivirus *scramble*.

Además, se realizaron de manera independiente al menos 3 infecciones y la siguiente generación de líneas de preadipocitos 3T3L1 sicav1 y *scramble* como se ha descrito en este apartado. Se trabajó con estas líneas de manera independiente para comprobar que los resultados mostrados usando estas líneas deficientes en caveolina-1 son reproducibles. Ya que esta línea celular, es muy sensible a diversos factores, como el subcultivo prolongado de la línea. Además, se ha de evitar tanto la confluencia de los preadipocitos de las células en división, como diluciones excesivas de los preadipocitos que fácilmente provocan la generación de subclones con fenotipo anómalo. La correcta diferenciación de esta línea celular también es sensible al tipo y lote de suero FBS y CS (ver apartado 1.3 y 1.8 de la sección Materiales y Métodos). Por eso es importante, trabajar con líneas “jóvenes” (pocas rondas de subcultivo), y repetir los experimentos con células procedentes de distintas congelaciones e infecciones para asegurar que estos factores no influyen en los resultados.

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

#### 3.1 Análisis de la presencia de caveolas en la membrana plasmática mediante microscopía electrónica

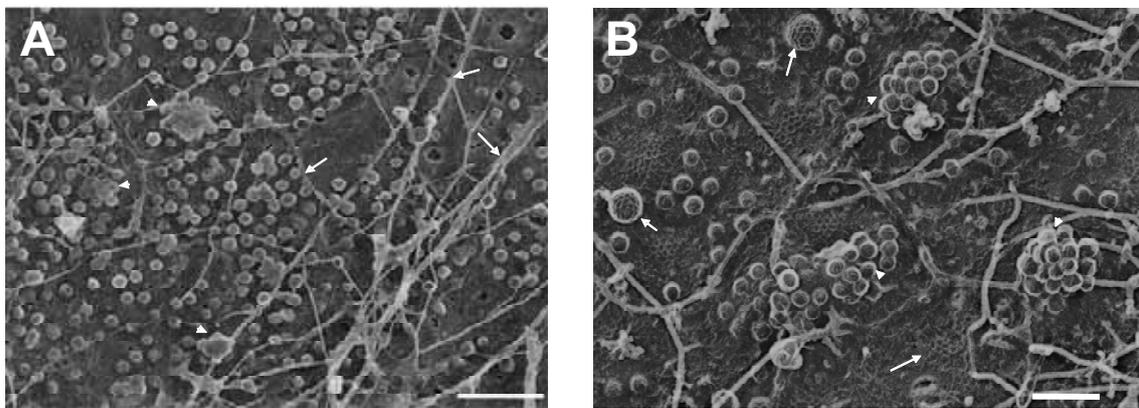
Para analizar la presencia de caveolas en la membrana plasmática de los adipocitos *scramble* y *sicav1* mediante microscopía electrónica, los adipocitos se recogieron y se fijaron en glutaraldehído 2,5% en PB 0,1 M durante 20 minutos, y se procesaron siguiendo el método de inclusión convencional y ultramicrotomía a temperatura ambiente (ver apartado 4.4.1 de la sección Materiales y Métodos). Este método ha sido usado por otros autores para observar la presencia de caveolas en células MEFs de los ratones KO de caveolina-1 (Razani *et al.*, 2002a) o en células 3T3L1 transfectadas con un siRNA contra caveolina-1 (Hong *et al.*, 2004). En la figura 19 observamos cortes ultrafinos de adipocitos *scramble* (A) y *sicav1* (B) incluidos en resina spurr, donde se pueden observar las estructuras vesiculares en forma de letra  $\Omega$  en sus membranas que son las caveolas. Se puede ver que en la membrana plasmática de los adipocitos *sicav1* aparecen menos caveolas y las que hay no se agrupan formando racimos.



**Figura 19.** Cortes de adipocitos *scr* (A) y *sicav1* (B) procesados por microscopía electrónica siguiendo el método de inclusión convencional y ultramicrotomía a temperatura ambiente. Escala 1 $\mu$ m. Las flechas indican los racimos de caveolas y las puntas de flecha indican las caveolas individuales.

Para caracterizar la presencia de caveolas en la membrana plasmática en nuestro laboratorio se había puesto a punto la técnica de microscopía electrónica del *freeze-drying* en adipocitos 3T3L1 (ver apartado 4.4.3 de la sección Materiales y Métodos). Esta técnica es idónea para la observación tridimensional de ciertas estructura del interior de la membrana plasmática como vesículas, depresiones y redes de clatrina, caveolas y filamentos del citoesqueleto, ya que permite observar una superficie mayor de la membrana plasmática que en el caso de los cortes ultrafinos, facilitando la identificación y cuantificación de las estructuras que aparecen en la membrana.

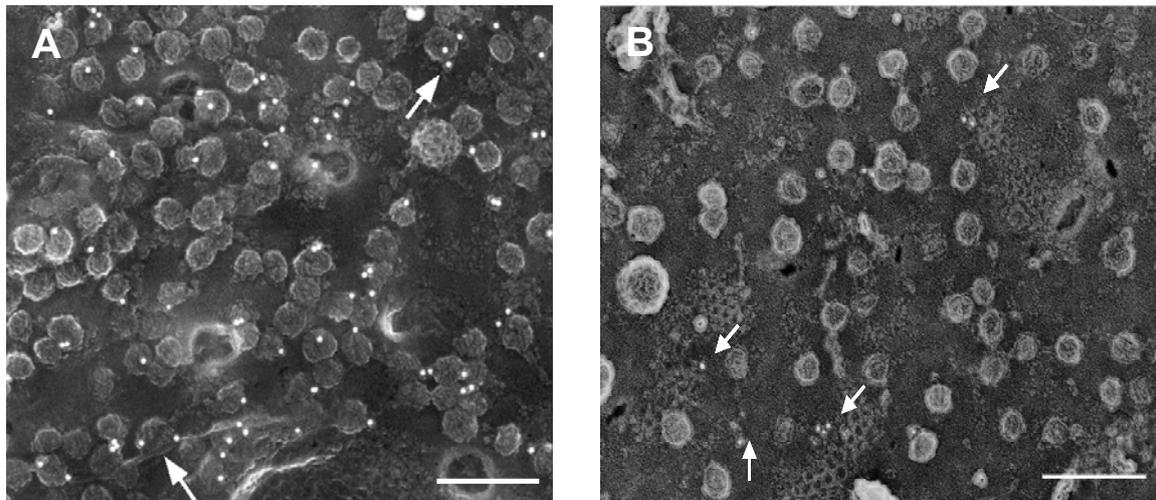
Como se puede observar en la figura 20 (imágenes de la Dra. Anna Ros), en las réplicas de carbono/platino de los fragmentos de membrana plasmática (*plasma membrane lawns*, pml) de adipocitos 3T3L1 obtenidas mediante la técnica de *freeze-drying*, se pueden ver filamentos de actina, redes y depresiones de clatrina y caveolas con aspecto de ovillo debido a la cubierta estriada que forman los oligómeros de caveolina-1. Se pueden observar también agrupaciones de caveolas formando racimos.



**Figura 20. Réplicas de la cara interna de fragmentos de membrana plasmática de adipocitos 3T3L1 obtenidas mediante la técnica de *freeze-drying*.** (A) Escala 250nm. Se pueden observar filamentos del citoesqueleto de actina (flechas) y caveolas y rosetas de caveolas (puntas de flecha). (B) Escala 200nm. Se pueden observar redes y depresiones de clatrina (flechas) y caveolas y racimos de caveolas (puntas de flecha)

Cuando se realizan experimentos de inmunolocalización sobre fragmentos de membrana plasmática sometidos a la técnica de *freeze-drying*, las réplicas no se digieren con lejía y se lavan con agua bidestilada durante cuatro días para preservar el oro coloidal unido a la muestra. El oro coloidal se detecta por transparencia ya que es electrodenso.

En la figura 21 A se muestra una inmunolocalización de caveolina-1 sobre fragmentos de membrana plasmática procedentes de adipocitos 3T3L1 realizada por la Dra. Anna Ros. Como se puede comprobar, la señal es específica de las estructuras que en la figura 20 hemos señalado como caveolas, ya que todas las partículas de oro están asociadas a ellas. También se realizó una inmunolocalización del receptor de transferrina (figura 21B), que como ya está descrito se localiza en las depresiones recubiertas de clatrina, redes de clatrina pero nunca en caveolas.



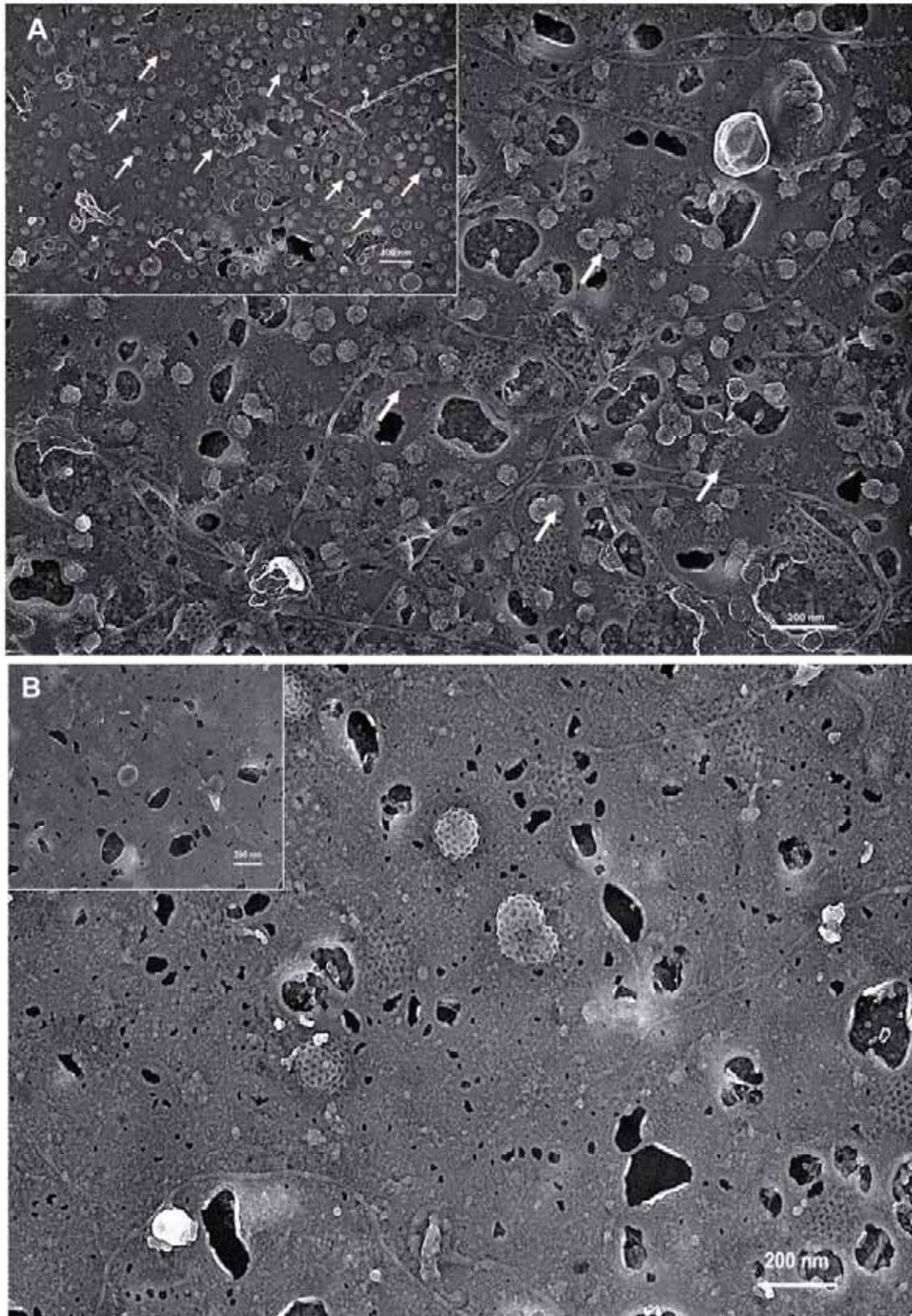
**Figura 21. (A) Inmunolocalización de caveolina-1** sobre fragmentos de membrana plasmática con un anticuerpo policlonal de caveolina-1 y un anticuerpo secundario goat anti-rabbit ligado a oro coloidal de 15 nm. Escala 100nm **(B) Inmunolocalización del receptor de transferrina** con un anticuerpo monoclonal anti-Tf R y un anticuerpo secundario goat anti-mouse ligado a oro coloidal de 10 nm. Escala 150 nm

Una vez comprobado que mediante la generación de fragmentos de membrana plasmática (*plasma membrana lawns*) y de sus réplicas de carbono/platino mediante la técnica de *freeze drying*, se pueden detectar y analizar la presencia de caveolas en la membrana plasmática mediante microscopía electrónica, decidimos estudiar las membranas de las líneas de adipocitos *scramble* y *sicav1* mediante esta técnica.

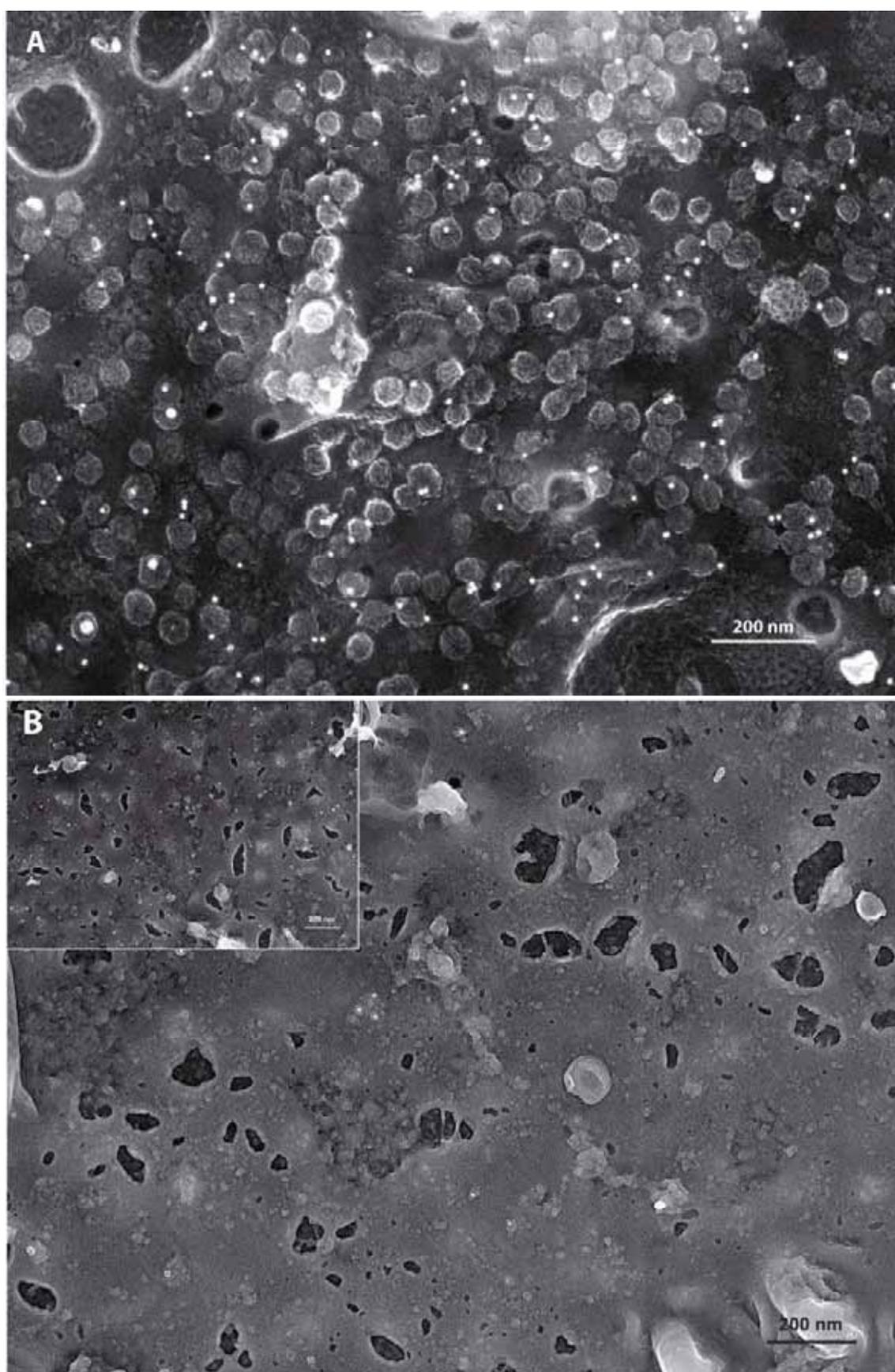
Así, como se puede observar en la figura 22, los adipocitos deficientes en caveolina-1 presentan mucha menor cantidad de caveolas, y además cuando aparecen, no forman racimos, que es algo muy habitual en los adipocitos 3T3L1.

Cuando cuantificamos el número de caveolas que aparecen por superficie de membrana plasmática analizando 20 muestras de fragmentos de membrana plasmática como los de la figura 22, obtuvimos que los adipocitos *sicav1* presentan un 90% menos de caveolas en su membrana que los adipocitos *scramble*.

En los fragmentos de membrana plasmática de los adipocitos *sicav1* (figura 23 B) aparece menor marcaje de caveolina-1 en la membrana plasmática que en los adipocitos *scramble* (figura 23 A), además, en la mayoría de las ocasiones, este marcaje no está asociado a caveolas. En cambio, en la membrana plasmática de adipocitos control (*scramble*) la caveolina-1 aparece fundamentalmente asociada a caveolas.



**Figura 22.** Réplicas de la cara interna de fragmentos de membrana plasmática de adipocitos 3T3L1 *scramble* y *sicav1* (deficientes en caveolina-1) obtenidas mediante la técnica de *freeze-drying*. Escala 200nm. A partir de adipocitos *scramble* (A) y *sicav1* (B) crecidos en cubreobjetos se obtuvieron fragmentos de membrana plasmática (apartado 4.1 de la sección Materiales y Métodos) y se analizaron sus réplicas de carbono/platino generadas mediante la técnica de *freeze drying* por microscopía electrónica. Las caveolas aparecen señaladas con flechas.



**Figura 23.** Inmunolocalización de caveolina-1 sobre fragmentos de membrana plasmática de adipocitos *scramble* (A) o *sicav1* (B), usando un anticuerpo policlonal de caveolina-1 y un anticuerpo secundario goat anti-rabbit ligado a oro coloidal de 15 nm, tal y como se explica en el apartado 4.4.4 de la sección Materiales y Métodos. Escala 200nm.

## 3.2 Análisis de los *rafts* lipídicos en los adipocitos deficientes en caveolina-1

### 3.2.1 Localización del gangliósido GM1 (en un fraccionamiento celular a lo largo de un gradiente de sacarosa)

Una vez habíamos comprobado que los adipocitos deficientes en caveolina-1 presentaban una marcada reducción en el número de caveolas en la membrana plasmática, decidimos analizar qué ocurría con los *rafts* lipídicos de estos adipocitos.

Una de las características bioquímicas de los *rafts* lipídicos/caveolas, que les confiere su particular composición, es que presentan una densidad de flotación inferior a la del resto de componentes de la membrana plasmática.

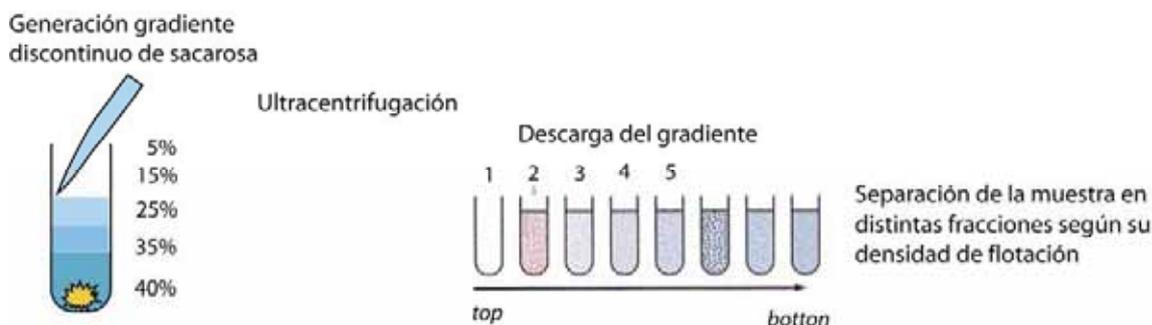
Para poder separar y analizar los *rafts* lipídicos de un homogenado de adipocitos, durante la lisis se ha de preservar la estructura de estos dominios de la membrana plasmática para poder ser posteriormente identificados. El método más habitual para aislar los *rafts* lipídicos/caveolas atendiendo a su densidad de flotación es la separación de las fracciones ligeras mediante la centrifugación de los homogenados celulares en un gradiente de sacarosa discontinuo.

Los dos métodos clásicos empleados para que durante la lisis celular se preserve la composición de los *rafts* lipídicos son:

- La extracción con Tritón-X-100 (Sargiacomo et al., 1993; Lisanti et al., 1994); (ver apartado 6.4.1 de la sección Materiales y Métodos). Está descrito que los *rafts* lipídicos son estructuras insolubles en Tritón-X-100 1% a 4°C (Smart et al., 1995). Esta insolubilidad ha sido atribuida al alto contenido en esfingolípidos de estos dominios, ya que los glicoesfingolípidos son insolubles por sí mismos y la esfingomielina es resistente a la extracción con detergente en presencia de colesterol (Schroeder et al., 1994). Las proteínas ancladas a la membrana por dominios GPI y las caveolinas (características de los *rafts* lipídicos) son resistentes a la solubilización por Tritón-X-100 (Rothberg et al., 1992; Brown et al., 1992; Lisanti et al., 1993).

- La extracción con carbonato sódico a pH11 (Song et al., 1996). El aislamiento de *rafts* lipídicos mediante métodos que usan detergente permite que proteínas residentes en caveolas pero que son solubles en Tritón-X-100, no queden retenidas durante la extracción. Así, la exposición de membranas celulares a pH elevados (pH 11) es un método astringente para examinar la asociación de proteínas con las membranas, de tal manera que las proteínas resistentes a la extracción son consideradas proteínas integrales de membrana (Olson and Spizz, 1986) (ver apartado 4.1.2 de la sección Materiales y Métodos).

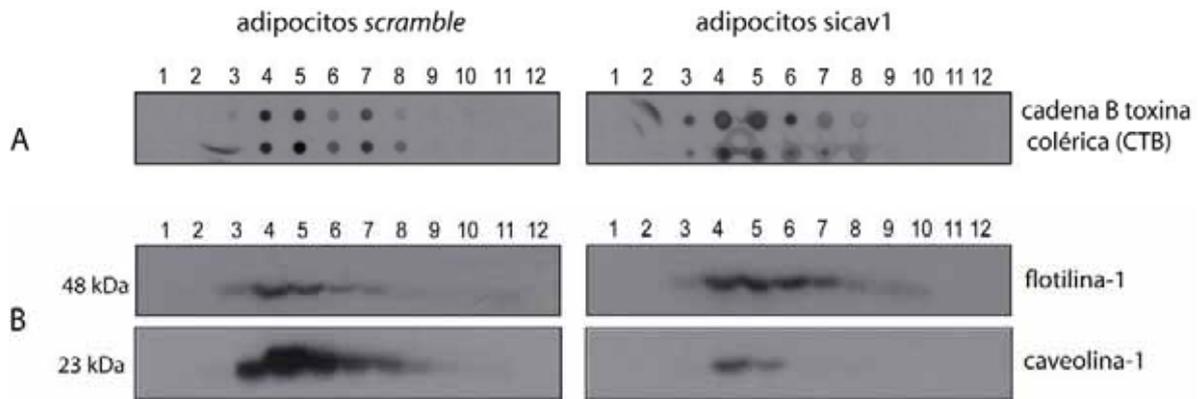
Cargaremos la muestra que se quiere separar en un tubo donde posteriormente creamos un gradiente de densidad discontinuo, resultado de apilar sucesivamente volúmenes homogéneos de soluciones de sacarosa de distinta densidad, de tal manera que, tras la ultracentrifugación, en las interfases de las distintas capas se acumularán las partículas que flotan (son menos densas) en la capa inferior pero que se hundan (son más densas) en la capa superior. Tras descargar el gradiente, como se muestra en el esquema inferior, ordenadamente desde la superficie del tubo, obtenemos las distintas fracciones de la muestra en función de su densidad de flotación.



Para analizar los *rafts* lipídicos de los adipocitos, estudiamos la distribución del gangliósido GM1 (Galactosil-n-acetilgalactosaminil-(n-acetilneuraminil)-galactosil glucosil ceramida), que es un esfingolípido complejo que contiene una cabeza polar muy grande formada por varias unidades glucídicas con un ácido graso insaturado de cadena larga unido a la esfingosina. Este gangliósido GM1 es característico de *rafts* lipídicos (Fra et al., 1995a; Trigatti *et al.*, 1999). Analizamos la unión de la toxina colérica al gangliósido GM1, ya que en adipocitos, ésta se internaliza vía caveola/ *rafts* lipídicos después de su unión al gangliósido GM1 (Orlandi, 1998 86 /id; Schnitzer, 1996 627 /id; Tran, 1987 628 /id).

Así, usamos las distintas fracciones de un gradiente de sacarosa obtenidas tras la extracción con Tritón-X-100 de los adipocitos *scramble* y sicav1, para realizar un *dot blot*, técnica semejante al *western blot*, pero en este caso las muestras de proteínas y lípidos no se separan primero mediante SDS-PAGE, sino que se colocan directamente sobre la membrana de nitrocelulosa en forma de manchas (*dot*) aisladas, esta membrana se incubaba con una solución que contiene la cadena B de la toxina colérica conjugada con HRP (peroxidasa de rábano) que se une específicamente al gangliósido GM1 (esfingolípido característico de *rafts* lipídicos) y así detectamos las fracciones que corresponden a los *rafts* lipídicos.

Como se observa en la figura 24 A, el gangliósido GM1 aparece tanto en adipocitos *scramble* como en los sicav1 en las fracciones ligeras (4 y 5). Para confirmar que las fracciones a las que se unía específicamente la toxina colérica eran *rafts* lipídicos, con las mismas muestras realizamos un western blot para detectar marcadores proteicos específicos de *rafts* lipídicos/caveolas como son la caveolina-1 y la flotilina-1 (figura 23 B), que de nuevo aparecen en las fracciones ligeras tanto en adipocitos *scramble* como en los sicav1.



**Figura 24.** Localización del gangliósido GM1 (A) y de la caveolina-1 y flotilina-1 (B) en las fracciones procedentes del gradiente de sacarosa tras la extracción con Tritón-X-100 1% en adipocitos *scramble* y deficientes en caveolina-1 (*sicav1*). Los adipocitos *scramble* y *sicav1* se homogeneizaron en presencia de Tritón-X-100 al 1% a 4°C y se centrifugaron en un gradiente discontinuo de sacarosa, como se explica en el apartado 4.4.1 de la sección Materiales y Métodos. El mismo volumen (30µl) de cada una de las fracciones recogidas después de la centrifugación (de la 1 a la 12) se analizó por dot blot usando la subunidad B de la toxina colérica conjugada con HRP (A) o por western blot usando los anticuerpos anti-caveolina-1 o anti-flotilina-1 (B).

### 3.2.2 Estudio de los marcadores proteicos de *rafts* lipídicos/caveolas

Está descrito que algunas proteínas como FAT/CD36 (*fatty acid translocase*), IR, (insulin receptor) o GLUT4 se localizan en caveolas en adipocitos 3T3L1. Nos propusimos analizar si, en ausencia (o deficiencia) de caveolina-1 y de caveolas, estos marcadores proteicos seguían asociados a *rafts* lipídicos o bien, cambiaban su distribución en la membrana de los adipocitos.

Para ello, de nuevo separamos los extractos celulares procedentes de los adipocitos *scramble* o *sicav1* mediante centrifugación a lo largo de un gradiente discontinuo de sacarosa. Los extractos celulares de adipocitos se obtuvieron, bien en presencia de Tritón-X-100 al 1% (figura 25), o bien, en ausencia de detergente, con carbonato de sodio a pH11 (figura 26). La extracción se realizó con los dos métodos, ya que como hemos descrito en el apartado 3.2.2, cada uno se basa en propiedades diferentes de las proteínas localizadas en los *rafts* lipídicos, en el primer caso, sólo las proteínas insolubles en Tritón-X-100 permanecen unidas a los *rafts* lipídicos y en el segundo caso, se establecen unas condiciones de unión de las proteínas a las membranas muy astringentes (pH11), las que permanecen unidas a la membrana migrarán a lo largo del gradiente de sacarosa con la fracción a la que pertenezcan, si pertenecen a *rafts* lipídicos, aparecerán en las fracciones ligeras.

Algunas proteínas como el receptor de insulina y FAT/CD36 se han localizado en caveolas mediante técnicas de microscopía confocal y electrónica (Gustavsson *et al.*, 1999; Ring *et al.*, 2006), o mediante métodos de inmovilización de caveolas (Souto *et al.*, 2003). Sin embargo, estas proteínas aparecen en las fracciones ligeras usando sólo uno de los dos métodos de extracción. Por ejemplo, CD36 sólo localiza en *rafts* lipídicos si usamos Tritón-X-100 durante la extracción (Pohl *et al.*, 2005), en cambio, el receptor de insulina sólo lo hace cuando usamos el método de carbonato pH11 (Gustavsson *et al.*, 1999; Vainio *et al.*, 2002).

Nos planteamos por tanto, analizar mediante ambos métodos de extracción la localización de distintas proteínas características de adipocitos y que se había descrito que localizaban en caveolas/ *rafts* lipídicos. Así observamos que la caveolina-1 y el transportador de glucosa GLUT4 aparecen, tanto extrayendo con detergente como en presencia de

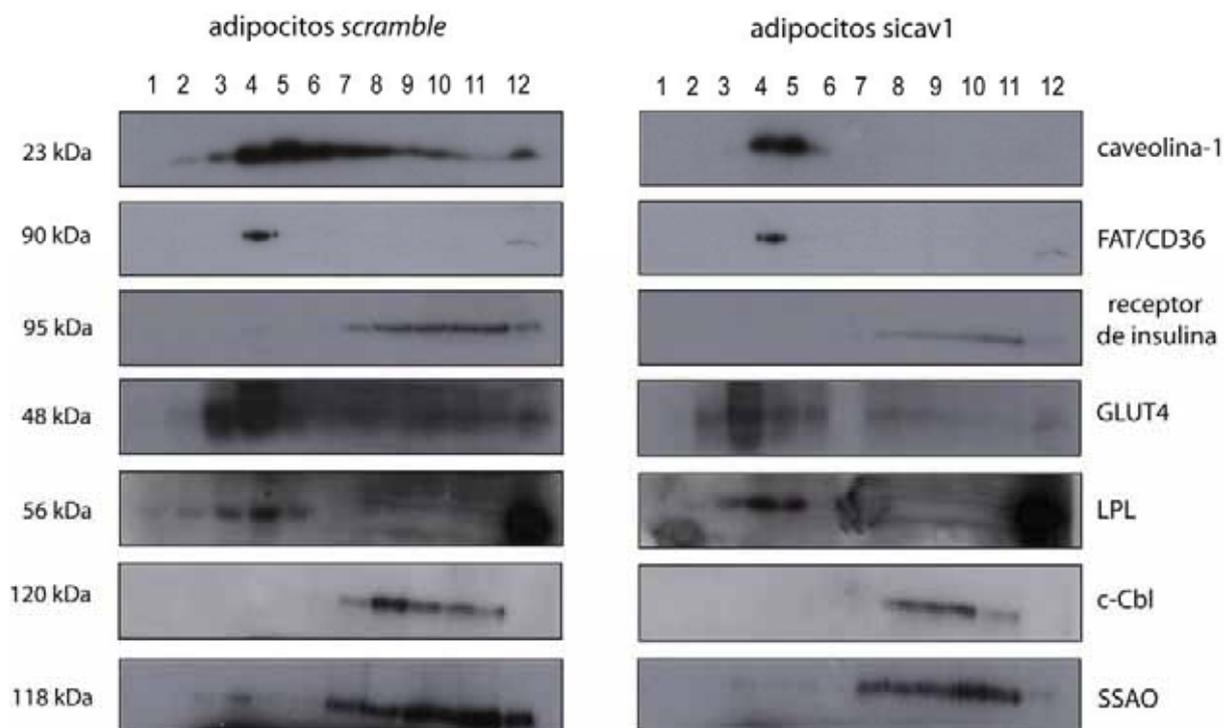
carbonato a pH11, en la fracción ligera del gradiente de sacarosa, en adipocitos *scramble* y en los sicav1.

CD36 y LPL (*lipoprotein lipase*, hidroliza los triacilglicéridos transportados por quilomicrones y las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) liberando ácidos grasos, (Goldberg, 1996) localizan en las fracciones ligeras (*rafts* lipídicos) cuando la extracción se realiza con detergente Tritón-X-100 a 4°C en los adipocitos *scramble* y en los sicav1.

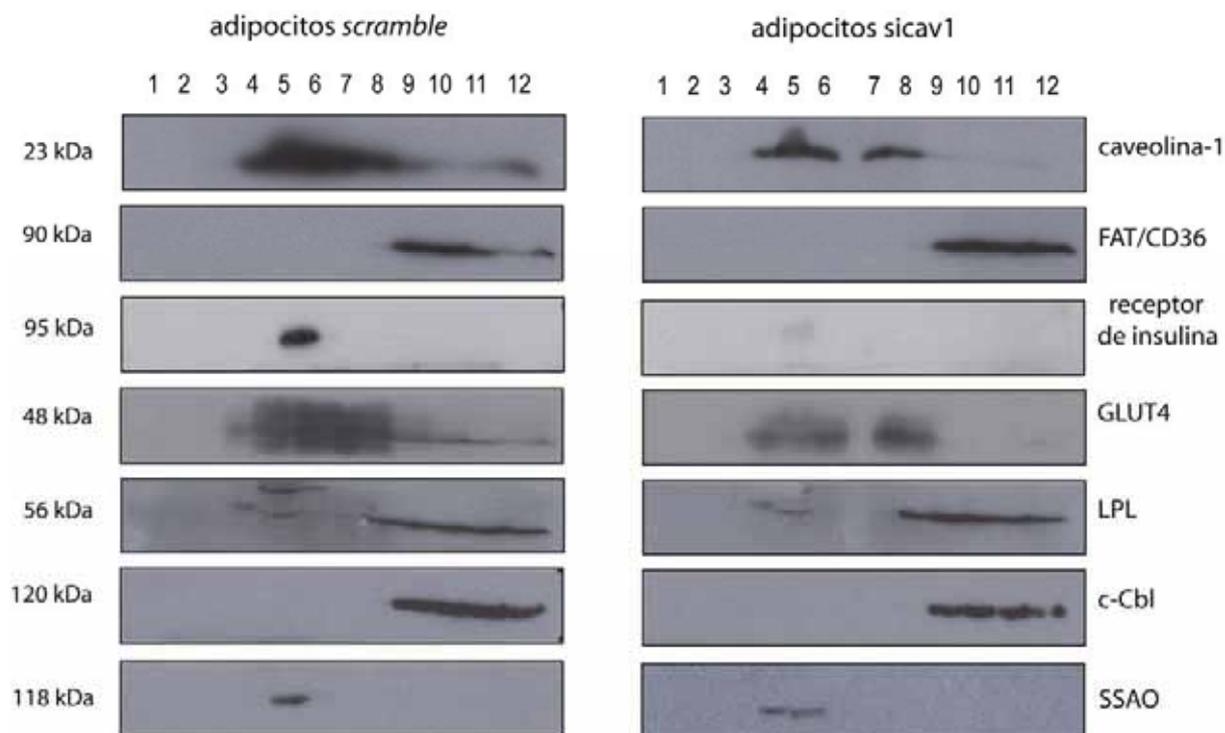
En cambio, IR y SSAO (*semicarbazide sensible amino-oxidase*) sólo aparecen en las fracciones ligeras cuando la extracción se realiza sin detergente. La presencia de SSAO en caveolas/ *rafts* lipídicos también se ha descrito por técnicas de inmunoadsorción de caveolas (Souto *et al.*, 2003).

La proteína c-Cbl como ya está descrito (Baumann *et al.*, 2000; Chiang *et al.*, 2001), sólo localiza en caveolas cuando los adipocitos son activados por la insulina, y además esta translocación a caveolas es muy transitoria. Así, vemos que mediante ambos métodos de extracción, c-Cbl aparece en las fracciones pesadas del gradiente de sacarosa.

Lo que sí observamos en todos los marcadores proteicos, es que se use el método de extracción con detergente o el método de carbonato de sodio pH11, los marcadores proteicos localizan en la misma fracción, tanto en adipocitos *scramble* como en los sicav1.



**Figura 25. Análisis de la localización en *rafts* lipídicos de marcadores proteicos usando extractos celulares de adipocitos *scramble* o *sicav1* obtenidos mediante la extracción con Tritón-X-100.** 6 placas de adipocitos (*scramble* o *sicav1*) se lisaron con un tampón que contenía Tritón-X-100 (concentración final 1%) a 4°C, y se le añadió el mismo volumen de una solución de sacarosa al 80% (concentración final 40%). Cada preparación (3ml) se colocó en el fondo de un tubo de 12ml y se añadió 2 ml de las soluciones de distinta concentración de sacarosa (35%, 25%, 15% y 5% sucesivamente). Se centrifugaron a 39.000 rpm durante 16 horas en un rotor SW41Ti (Beckmann). Se recogieron fracciones de 1ml desde la parte superior del tubo (fracción 1) hasta el fondo (fracción 11)(la fracción 12 corresponde al pellet). El mismo volumen (30µl) de cada una de las fracciones fue analizado por SDS-PAGE y posterior western blot usando los anticuerpos anti-caveolina-1, anti-CD36, anti-receptor de insulina, anti-GLUT4, anti-LPL, anti c-Cbl, y anti-SSAO.



**Figura 26.** Análisis de la localización en *rafts* lipídicos de marcadores proteicos usando extractos celulares de adipocitos *scramble* o *sicav1* obtenidos mediante la extracción sin detergente (método carbonato de sodio pH11). 6 placas de adipocitos (scr o sicav1) se lisaron con el tampón sin detergentes de carbonato de sodio pH11, y se le añadió el mismo volumen de una solución de sacarosa al 80% (concentración final 40%). Cada preparación (3ml) se colocó al fondo de un tubo de 12ml y se fue cubriendo con 2 ml de las soluciones de distinta concentración de sacarosa (35%, 25%, 15% y 5% sucesivamente). Se centrifugaron a 39.000 rpm durante 16 horas en un rotor SW41Ti (Beckmann). Se recogieron fracciones de 1ml desde la parte superior del tubo (fracción 1) hasta el fondo (fracción 11)(la fracción 12 corresponde al pellet). El mismo volumen de cada una de las fracciones fue analizado por SDS-PAGE y posterior western blot usando los anticuerpos anti-caveolina-1, anti-CD36, anti-receptor de insulina, anti-GLUT4, anti-LPL., anti c-Cbl, y anti-SSAO.

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

Una vez habíamos analizado las características de las caveolas y/o los *rafts* lipídicos en los adipocitos *scramble* y *sicav1* nos propusimos estudiar si la diferenciación a adipocito de los preadipocitos *sicav1* era correcta y similar a la de los preadipocitos control (*scramble*).

Durante el proceso de diferenciación (ver apartado 1.8 de la sección Materiales y Métodos) como se explica en el apartado 3.1 de la sección Introducción, se activan una serie de factores de transcripción primarios (*c/EBPβ* y *c/EBPδ*) que llevan a la activación de otros factores de transcripción (*PPARγ* y *c/EBPα*) de tal manera que finalmente, en conjunto, llevan a activar la expresión de proteínas características de los adipocitos, muchas de las cuales están implicadas en la acumulación de lípidos y en su metabolismo.

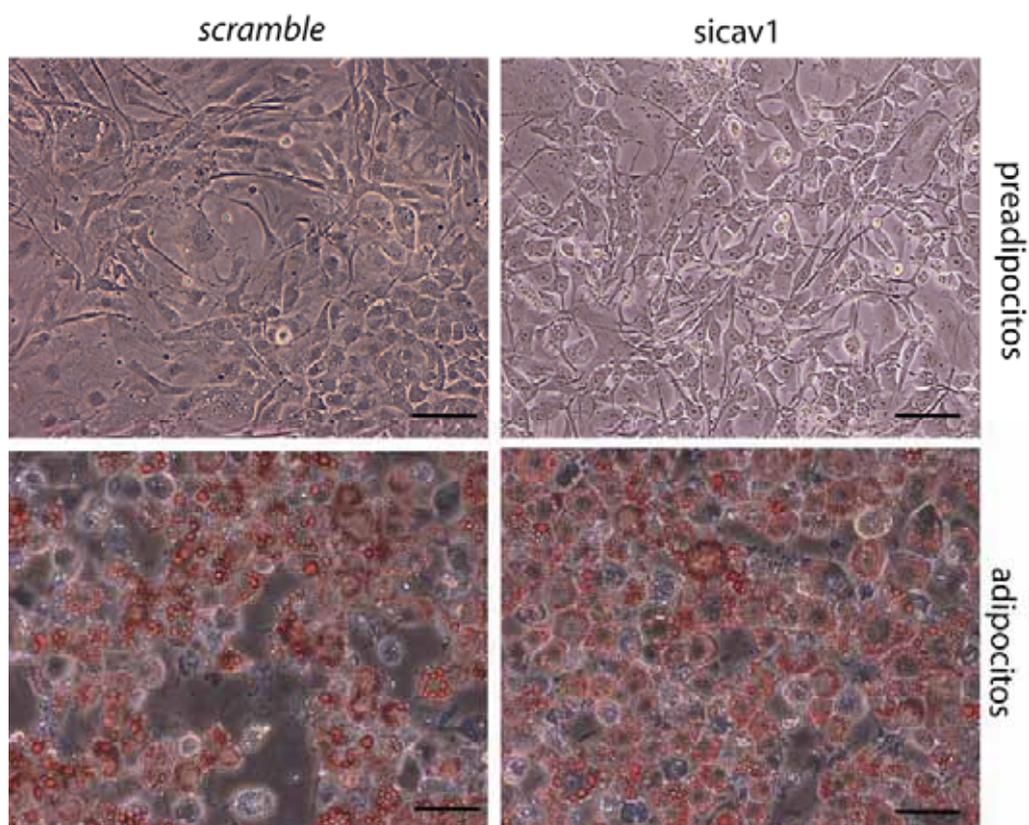
### 4.1 Análisis de la morfología y contenido lipídico de los adipocitos

#### 4.1.1 Tinción Oil-red O

Durante la fase de crecimiento las células precursoras de los adipocitos 3T3L1 (preadipocitos) son morfológicamente similares a los fibroblastos. La confluencia y la inducción de la diferenciación mediante insulina 5μg/ml, dexametasona 0.25 μM y 1-metil-3-isobutilxantina (IBMX) 0.5mM (ver apartado 1.8 de la sección Materiales y Métodos) origina cambios drásticos en la morfología y fisiología del adipocito. Los preadipocitos adoptan una forma esférica, comienzan a almacenar triacilglicéridos (TAG) con la consecuente aparición de las gotas lipídicas (*lipid droplets*, LDs), y de manera progresiva consiguen las características morfológicas y bioquímicas propias de los adipocitos blancos maduros, gracias a la expresión secuencial de determinados genes involucrados en el proceso de adipogénesis.

Así para observar la morfología de los LDs se procedió a la tinción “*oil red O*”. Esta técnica se usa para teñir TAG de células fijadas. Su visualización se realiza a través de un microscopio óptico con contraste de fases.

Como se puede observar en la figura 27, los preadipocitos (tanto *scramble* como *sicav1*) tienen aspecto de fibroblastos y no se detecta ningún acúmulo lipídico en el interior celular. En cambio, una vez finalizado el proceso de diferenciación, los adipocitos adoptan una forma redondeada y acumulan lípidos formando LDs que quedan teñidos usando la tinción “*oil red O*”. No se observa ninguna diferencia entre los adipocitos control (*scr*) y deficientes en caveolina-1 (*sicav1*) en cuanto a su morfología y la cantidad y tamaño de sus LDs.

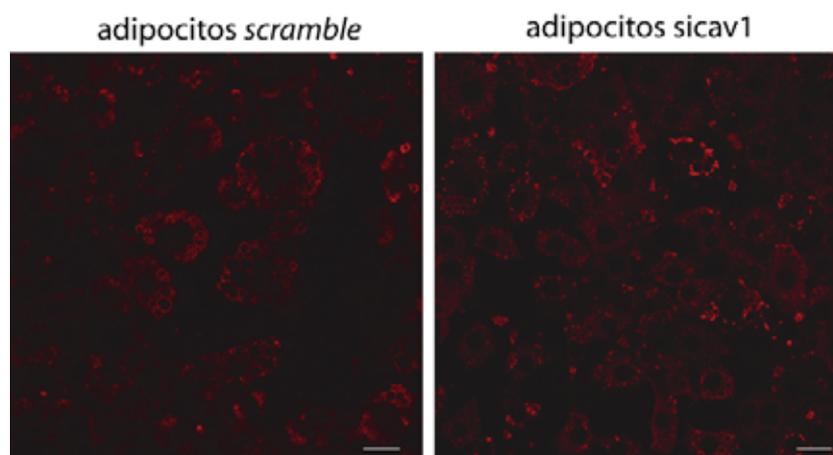


**Figura 27.** Tinción "Oil Red O" de preadipocitos y adipocitos 3T3L1 *scramble* y *sicav1*. Tanto preadipocitos en estado proliferativo, como los adipocitos maduros fueron fijados y se sometieron a la tinción oil red O (tinción de TAG) como se explica en el apartado 4.2 de la sección Materiales y Métodos. Las imágenes se capturaron usando el objetivo 20X de un microscopio óptico de contraste de fases. Escala 80 $\mu$ m

#### 4.1.2 Inmunolocalización de perilipina

Como se ha explicado en el apartado 2.4.5 de la sección Introducción, los LDs están formadas por un núcleo de lípidos neutros, rodeado por una monocapa de fosfolípidos, colesterol y proteínas. Las proteínas mejor caracterizadas son las de la familia PAT: Perilipina, Adipofilina (ADRP), TIP47 y S3-12 (revisión (Martin *et al.*, 2005). De ellas, la primera que se localizó en la superficie de los LDs fue la perilipina (Blanchette-Mackie *et al.*, 1995; Brasaemle *et al.*, 1997; Greenberg *et al.*, 1991; Greenberg *et al.*, 1993; Londos *et al.*, 1999; Servetnick *et al.*, 1995). Es una proteína restringida a los adipocitos maduros y a las células esteroideogénicas del córtex adrenal, células especializadas en el almacenamiento de lípidos.

Nos planteamos por tanto observar la presencia de la perilipina en la superficie de los LDs por microscopía confocal mediante inmunolocalización, usando un anticuerpo anti-perilipina. Como se puede observar en la figura 28, la ausencia de caveolina-1 en los adipocitos *sicav1* no parece afectar la presencia de perilipina en la superficie de los LDs, que además presentan un aspecto similar en ambas líneas de adipocitos (*scramble* y *sicav1*).



**Figura 28.** Inmunolocalización de perilipina en adipocitos *scramble* y *sicav1*. Los adipocitos crecidos en cubreobjetos fueron fijados, y la inmunodetección se llevó a cabo como se explica en el apartado 4.3 de la sección Materiales y Métodos, usando un anticuerpo anti perilipina (Research diagnostic 1/500) y un anticuerpo secundario anti-guinea pig conjugado con AlexaFluor568. Escala 25 $\mu$ m

#### 4.1.3 Cuantificación de triglicéridos y colesterol total en los adipocitos

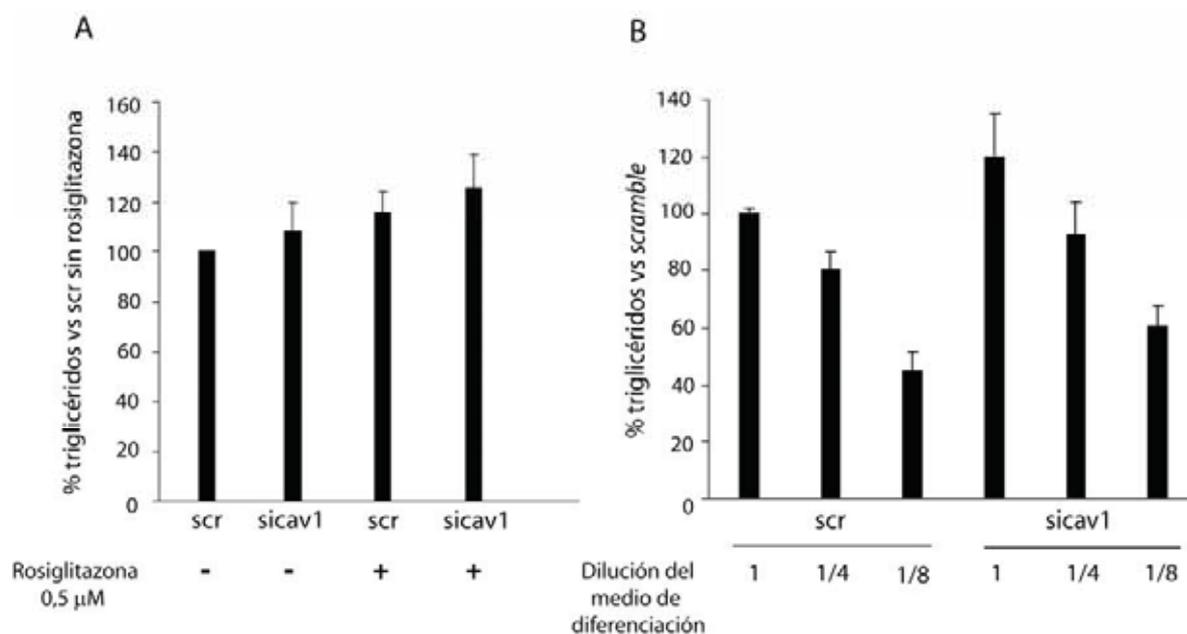
Una vez habíamos observado la morfología de los adipocitos maduros y de sus LDs, para comprobar la correcta diferenciación a adipocito en lo que se refiere a su contenido lipídico, decidimos comparar la cantidad total de triglicéridos (TAG) entre estas células. Además, nos planteamos por un lado forzar la diferenciación de los preadipocitos mediante la adición al cóctel de diferenciación habitual (insulina, dexametasona e IBMX) de rosiglitazona 0,5  $\mu$ M, que es un ligando artificial de PPAR $\gamma$  de la clase de drogas “*thiazolidinedione*” (tiazolidinediona) que permite una diferenciación más rápida y eficiente de los preadipocitos (Kletzien et al., 1992; Lehmann et al., 1995; Willson et al., 1996; Gimble et al., 1996). Y por otro lado, disminuimos la concentración de los componentes del cóctel a 1/4 y 1/8 de la concentración inicial. La intención era estudiar un rango de condiciones de diferenciación y ver si en algún caso la deficiencia en caveolina-1 de los adipocitos *sicav1* provocaba alguna diferencia en la cantidad total de TAG acumulados en los adipocitos maduros (que es un indicativo de un estado final de diferenciación).

Como podemos observar en la figura 29 A, no se observan diferencias en la cantidad de TAG en los extractos celulares obtenidos de adipocitos *scramble* y *sicav1*, ni bajo las condiciones habituales de diferenciación ni añadiendo rosiglitazona 0.5  $\mu$ M.

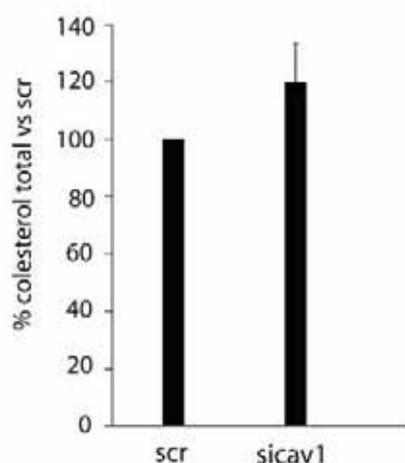
Cuando trabajamos en unas condiciones de diferenciación subóptimas (figura 29 B) observamos que, efectivamente, la cantidad de TAG de los adipocitos disminuye al diluir el cóctel de diferenciación, pero de nuevo, este efecto es idéntico en adipocitos *scramble* y *sicav1*.

Por último, en relación al contenido lipídico de los adipocitos, quisimos comprobar la cantidad de colesterol total (libre y esterificado) de estas células, ya que se ha descrito un papel importante de la caveolina en la homeostasis del colesterol celular (revisión Martin *et al.*, 2005). De hecho, caveolina-1 interacciona con el colesterol de las membranas y es necesario para que caveolina-1 llegue hasta la membrana plasmática (Murata *et al.*, 1995). Además, se ha descrito que células MEF (*mouse embryonic fibroblast*) y MPM (*mouse peritoneal macrophages*) de ratones KO de caveolina-1 apenas presentan colesterol libre (Frank et al., 2006).

Como se muestra en la figura 30, no se observa ninguna diferencia en la cantidad de colesterol total entre los adipocitos *scramble* y los *sicav1*.



**Figura 29. Valoración de la cantidad de triglicéridos en adipocitos *scramble* (scr) y *sicav1*.** Los adipocitos fueron diferenciados con el cóctel de diferenciación habitual sin rosiglitazona (insulina 5  $\mu$ g/ml, dexametasona 0.25  $\mu$ M y 1-metil-3-isobutilxantina (IBMX) 0.5mM) o con este cóctel y rosiglitazona 0.5  $\mu$ M (+ rosiglitazona) (Figura 29 A), o bien, con el cóctel habitual diluido 8 veces (1/8), 4 veces (1/4) o sin diluir (1) (Figura 29 B). A los 10 días de comenzar el proceso de diferenciación (ver apartado 1.8 de la sección Materiales y Métodos) los adipocitos se lisaron usando una jeringa con aguja 25G en un tampón con Igepal 1%. Se valoró la cantidad de triglicéridos en cada extracto celular usando el Kit de triglicéridos de BioSystems (apartado 5.9 de la sección Materiales y Métodos). En la gráfica A se muestra la media de 7 experimentos normalizada respecto a la cantidad de triglicéridos de los adipocitos *scramble* diferenciados sin rosiglitazona (0,4 nmoles triglicéridos/ $\mu$ l/ $\mu$ g proteína) En la figura B, represento la media de 3 experimentos normalizada respecto a la cantidad de triglicéridos en los adipocitos *scramble* diferenciados con el cóctel habitual sin diluir (0.36 nmoles triglicérido/ $\mu$ g proteína)



**Figura 30. Valoración de la cantidad de colesterol total en adipocitos *scramble* (scr) y *sicav1*.** Los adipocitos maduros se lisaron usando una jeringa con aguja de 15G de diámetro en un tampón con Igepal 1%. Se valoró la cantidad de colesterol total (libre+esterificado) en cada extracto celular usando el Kit de colesterol de BioSystems (apartado 5.10 de la sección Materiales y Métodos). En la gráfica se muestra la media de 6 experimentos normalizada respecto a la cantidad de colesterol total de los adipocitos *scramble* (0,07 nmoles triglicéridos/ $\mu$ g proteína).

## 4.2 Estudio de marcadores proteicos de diferenciación

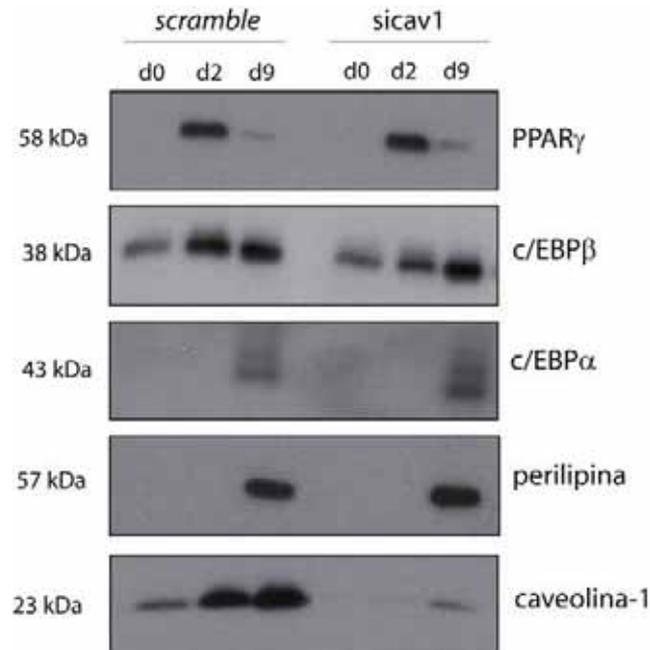
### 4.2.1 Expresión de factores de transcripción

El proceso de diferenciación desde preadipocitos 3T3L1 hasta adipocitos maduros se realiza como se explica en el apartado 1.8 de la sección Materiales y Métodos y está resumido en la figura 9 del apartado 3.1 de la sección Introducción. Brevemente, los preadipocitos sembrados se dejan crecer en la placa en medio DMEM 10% CS hasta que llegan a confluencia, dos días después de este momento es el que denominamos día0 (d0) y es cuando añadimos el cóctel de diferenciación (insulina, dexametasona e IBMX). Dos días después (día2, d2), cambiamos este medio por otro al que esta vez sólo añadimos insulina. Tras tres días con este medio, se lo cambiaremos por el medio que mantendrán ya el resto del tiempo (DMEM con 10% de FBS), este es el día 5, a partir del día 9-10 los adipocitos se consideran ya maduros.

Durante este proceso se activa toda una cascada transcripcional ampliamente descrita (Farmer, 2005; Fajas, 2003; Rosen and Spiegelman, 2000a; Rosen et al., 2000b; Prusty et al., 2002; Tzameli *et al.*, 2004). En esta cascada hay tres factores de transcripción, entre otros, que son fundamentales: los primeros factores de transcripción que se inducen son *c/EBP $\beta$*  y *c/EBP $\delta$* . *c/EBP $\beta$*  activa, por un lado la expresión de *PPAR $\gamma$*  y por otro la síntesis de ligandos de *PPAR $\gamma$* , *PPAR $\gamma$*  a su vez también activa la expresión de *c/EBP $\alpha$* . Estos tres factores de transcripción activan a otros factores de transcripción (como *ADD1/SREBP1*) y provocan finalmente la expresión de genes característicos de los adipocitos (*GLUT4*, *perilipina*, *aP2*; *adiponectina* o *caveolina-1*).

Para continuar analizando la diferenciación de los adipocitos deficientes en *caveolina-1* quisimos analizar el patrón de expresión de estos tres factores de transcripción durante la diferenciación. Para ello realizamos un western blot usando los extractos celulares de preadipocitos en diferentes momentos del proceso de diferenciación, el día0, el día2 y el día9 (ya adipocitos), empleando los anticuerpos contra los factores de transcripción anti-*PPAR $\gamma$* , *c/EBP $\beta$* , *c/EBP $\alpha$* . Para comprobar el estado de diferenciación de los adipocitos también miramos la expresión de *perilipina*, que es un marcador característico de adipocito maduro.

Como se puede observar en la figura 31, *c/EBP $\beta$*  es el primer factor de transcripción que se detecta e incrementa sus niveles de expresión a lo largo de la diferenciación. *PPAR $\gamma$* , en cambio, aumenta su expresión dos días después de añadir el cóctel de diferenciación (d2) y disminuye después, aunque continúa presente en el adipocito maduro. *c/EBP $\alpha$*  presenta el aumento de expresión más tardío, ya que el día2 aún no se detecta su expresión. Tras 9 días de comenzar el proceso de diferenciación (d9) los adipocitos expresan ya *perilipina* que es un marcador de adipocito diferenciado. Vemos, que los perfiles de expresión de todas estas proteínas son similares en las células *scramble* y *sicav1*.



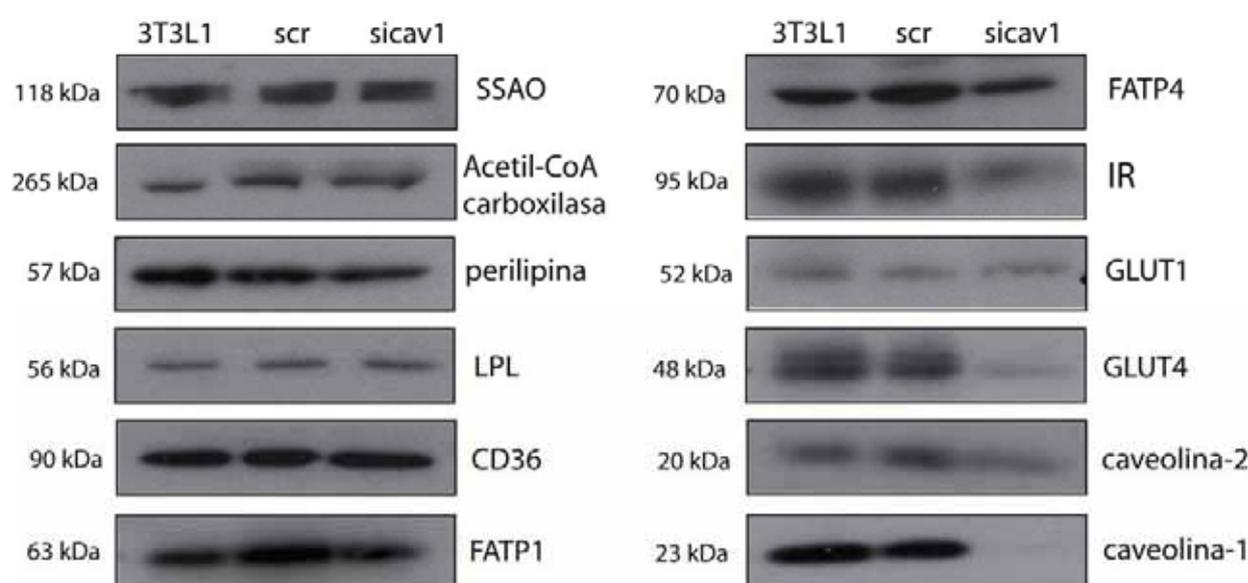
**Figura 31. Expresión de los factores de transcripción durante la adipogénesis de preadipocitos scramble y deficientes en caveolina-1 (sicav1).** Los preadipocitos 3T3L1 *scramble* y *sicav1* proliferativos se cultivaron en medio de crecimiento (10%CS, apartado 1.3.2 de la sección Materiales y Métodos) hasta que alcanzaron la confluencia. 2 días después (d0) las células ya quiescentes fueron expuestas al cóctel de diferenciación (insulina 5µg/ml, dexametasona 0.25 µM y 1-metil-3-isobutilxantina (IBMX) 0.5mM) en medio con FBS. Tras dos días (d2), este medio se cambió por otro al que sólo se añadió la insulina, después de 3 días más (le llamamos día3) el medio se cambió por uno con 10% de FBS. 3 días más tarde (d6) los adipocitos están ya diferenciados. En los tiempos indicados, día0, día2 y día6, se obtuvieron los extractos proteicos de las células. La misma cantidad (50 µg) de proteína de cada muestra se sometió al análisis por western blot usando anticuerpos específicos anti-PPAR $\gamma$ , anti-c/EBP $\beta$ , anti-c/EBP $\alpha$ , anti-perilipina y anti-caveolina-1

#### 4.2.2 Expresión de marcadores característicos de adipocitos diferenciados

El siguiente paso que nos plantemos para estudiar la diferenciación de los adipocitos 3T3L1 deficientes en caveolina-1 en relación a los adipocitos control, fue analizar la expresión de toda una serie de proteínas que comienzan a expresarse durante la adipogénesis y que son marcadores característicos de adipocitos maduros.

Así, analizamos la expresión de: SSAO (*semicarbazide sensible amino-oxidase*) que es una proteína muy abundante en la membrana de adipocitos cuya expresión se induce durante la adipogénesis.; Acetil-CoA-carboxilasa, proteína citosólica clave en la síntesis de ácidos grasos (implicada en la síntesis de malonil-CoA a partir de acetil-CoA) muy regulada hormonalmente (insulina, glucagón, adrenalina); perilipina como hemos descrito en este capítulo (4.1.2) y en el apartado 2.4.5 de la sección Introducción es una proteína localizada en la superficie de los LDs de adipocitos maduros, LPL (*lipoprotein lipase*) es un enzima anclada en el endotelio fundamental en el metabolismo lipídico a través de la hidrólisis de los triglicéridos transportados por los quilomicrones y las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL)(Goldberg, 1996). FAT/CD36 (*fatty acid transporter*) y FATP1 (*fatty acid transport protein-1*) son proteínas de la membrana plasmática que facilitan la entrada de ácidos grasos de cadena larga (LCFA) cuya expresión se induce fuertemente durante el proceso de diferenciación desde fibroblastos a adipocitos (Abumrad *et al.*, 1991;Stahl *et al.*, 2002). FATP4

pertenece a la familia de FATP1 aunque a diferencia de esta, no es específica de adipocito, sino que su expresión mayoritaria es en las células endoteliales del intestino delgado (Stahl *et al.*, 1999; Stahl *et al.*, 2001). GLUT4 y GLUT1 pertenecen a la familia de transportadores de glucosa GLUT (apartado 3.2.1 de la sección Introducción) constituida por 13 miembros, cada uno con distribuciones tisulares diferentes, y propiedades cinéticas, de sustrato y de localización celular específicas. Así, la expresión del transportador GLUT4 está restringida fundamentalmente al tejido adiposo y muscular y es responsable del incremento del transporte de glucosa que provoca la insulina. GLUT1 en cambio se expresa ubicuamente y es responsable del transporte de glucosa basal (revisión Khan and Pessin, 2002; Bryant *et al.*, 2002). El receptor de insulina (IR) es un receptor transmembrana con actividad tirosina-quinasa especialmente abundante en tejidos que responden a la insulina (hígado, músculo estriado y tejido adiposo), de hecho está descrito un importante incremento de su expresión durante la diferenciación adipocitaria.

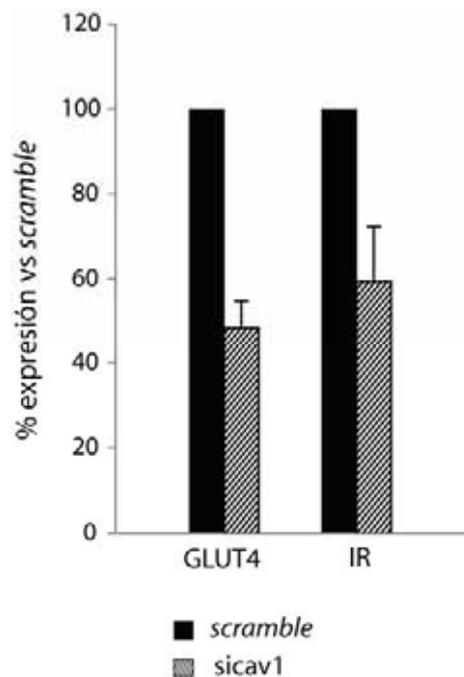


**Figura 32. Expresión de proteínas características de adipocitos maduros en adipocitos 3T3L1 sin infectar, *scramble* y *sicav1*.** Los adipocitos tras 10 días de comenzar el proceso de diferenciación se lisaron en tampón HES (apartado 6.3 de la sección Materiales y Métodos). Los homogenados se centrifugaron a 5000 rpm 5 minutos para eliminar los restos celulares y el sobrenadante se centrifugó a 55000 rpm (rotor TLA 55) durante 2 horas para obtener un pellet con las membranas totales de las células. Este pellet se resuspendió en Hepes 20mM. La misma cantidad (10  $\mu$ g) de proteínas de las membranas obtenidas se usó para realizar un western blot con los anticuerpos anti-SSAO, anti-LPL, anti-CD36, anti-FATP1, anti-FATP4, anti-IR, anti-GLUT4, anti-GLUT1, anti-caveolina-2 y anti-caveolina-1. Para detectar la acetil-CoA-carboxilasa y la perilipina se usaron 50  $\mu$ g de proteína de los extractos celulares antes de centrifugarlos para obtener las membranas.

Como se puede observar en la figura 32 de todos los marcadores proteicos característicos de adipocitos diferenciados analizados, la expresión de IR, GLUT4 y caveolina-2 era menor en adipocitos deficientes en caveolina-1. También se analizó la expresión de todas estas proteínas en adipocitos 3T3L1 que no habían sido infectados para comprobar que efectivamente, la expresión de estos marcadores de diferenciación es similar en los adipocitos *scramble* y no se ve afectada por la integración vírica en el genoma de las células. La disminución de la expresión de caveolina-2 no responde a una menor diferenciación sino a que

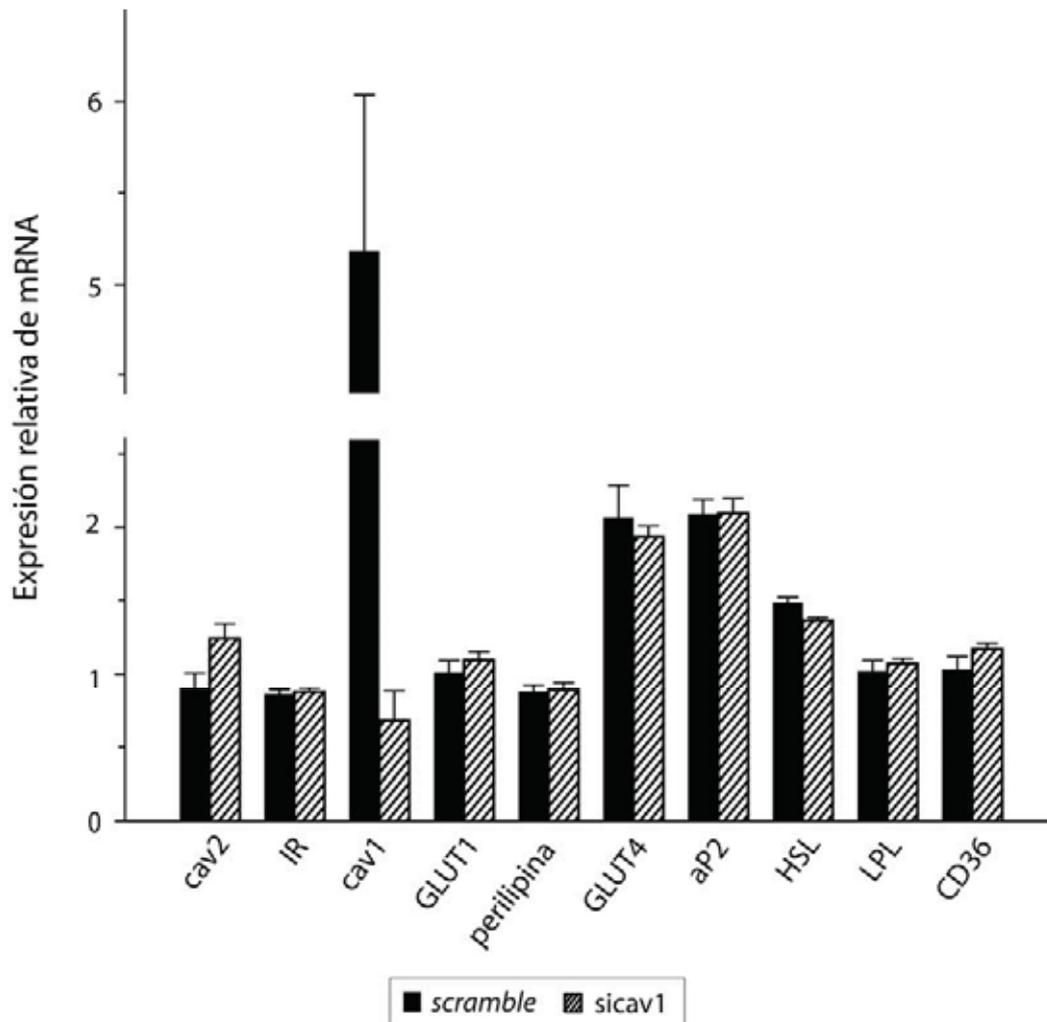
la estabilidad y la llegada a membrana de caveolina-2 depende de la presencia de caveolina-1 de tal manera que en ausencia de caveolina-1 (o cuando su expresión es muy reducida), caveolina-2 se degrada antes de llegar a la membrana (Okamoto *et al.*, 1998; Parton, 1996; Drab *et al.*, 2001; Hong *et al.*, 2004).

Se cuantificó la disminución en la expresión de GLUT4 y de IR mediante densitometría de las bandas obtenidas por western blot, usando dos programas informáticos, el programa “quantity1 de Invitrogen” y “genetools” de Syngene. El resultado fue que los adipocitos deficientes en caveolina-1 presentan una disminución del 50% en la expresión de GLUT4 y del 40% en la expresión de IR (figura 33).



**Figura 33. Cuantificación de la disminución de la expresión de las proteínas IR y GLUT4 en adipocitos scramble y sicav1.** Se procedió a la cuantificación mediante densitometría, de las bandas obtenidas por western blot correspondientes a las proteínas IR y GLUT4, de 9 experimentos independientes como el explicado en la figura 32.

Una vez habíamos determinado que dos proteínas, GLUT4 e IR, presentaban disminuida su expresión en los adipocitos sicav1, y que este hecho no respondía a una peor diferenciación (al menos en lo que respecta a su morfología y la de sus LDs, contenido de triglicéridos y colesterol, ni expresión de factores de transcripción y marcadores proteicos de diferenciación adipocitaria). Quisimos analizar los niveles de RNA mensajero (mRNA) de estas proteínas (IR, GLUT4 y caveolina-2) y de otros marcadores de diferenciación (GLUT1, perilipina, aP2, HSL, LPL, CD36/FAT) mediante PCR a tiempo real. aP2 (*fatty acid binding protein*) es una proteína que aparece durante la diferenciación adipocitaria y es crucial en la síntesis de ácidos grasos. HSL (*hormone sensible lipase*) esta lipasa está involucrada en el metabolismo lipídico, siendo un punto clave en la regulación de la lipólisis por catecolaminas.



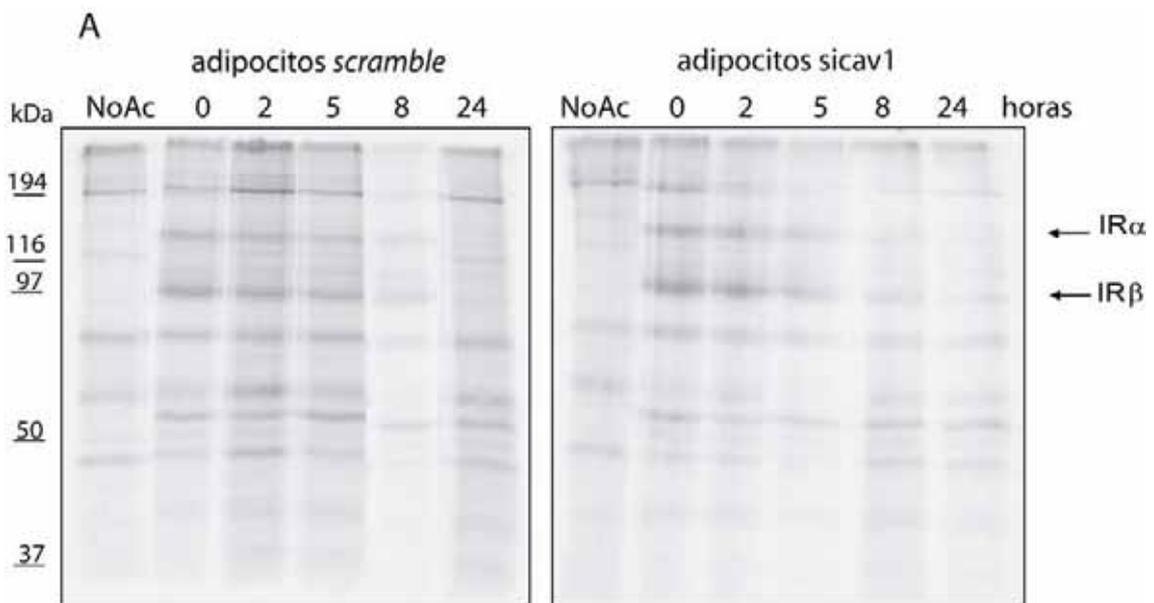
**Figura 34. Comparación de la expresión de genes característicos de adipocitos entre los adipocitos *scramble* y *sicav1* mediante PCR a tiempo real.** Se extrajo el mRNA de adipocitos maduros (10 días después de comenzar la diferenciación), a partir del cual se consiguió el cDNA de cada una de las muestras de adipocitos (*scr* y *sicav1*) mediante retrotranscripción (ver apartado 12.3 de la sección Materiales y Métodos). Se procedió a realizar la PCR a tiempo real usando los oligonucleótidos cebadores (*primers*) para cada uno de los genes que aparecen en la gráfica y cuya secuencia aparece en el apartado 12.4.3 de la sección Materiales y Métodos. Se representa la media de los valores de expresión de cada gen normalizados respecto a la expresión de ciclophilinaA de 7 experimentos (se obtuvieron resultados similares normalizando respecto a la expresión de aRP, *acidic ribosomal protein*)

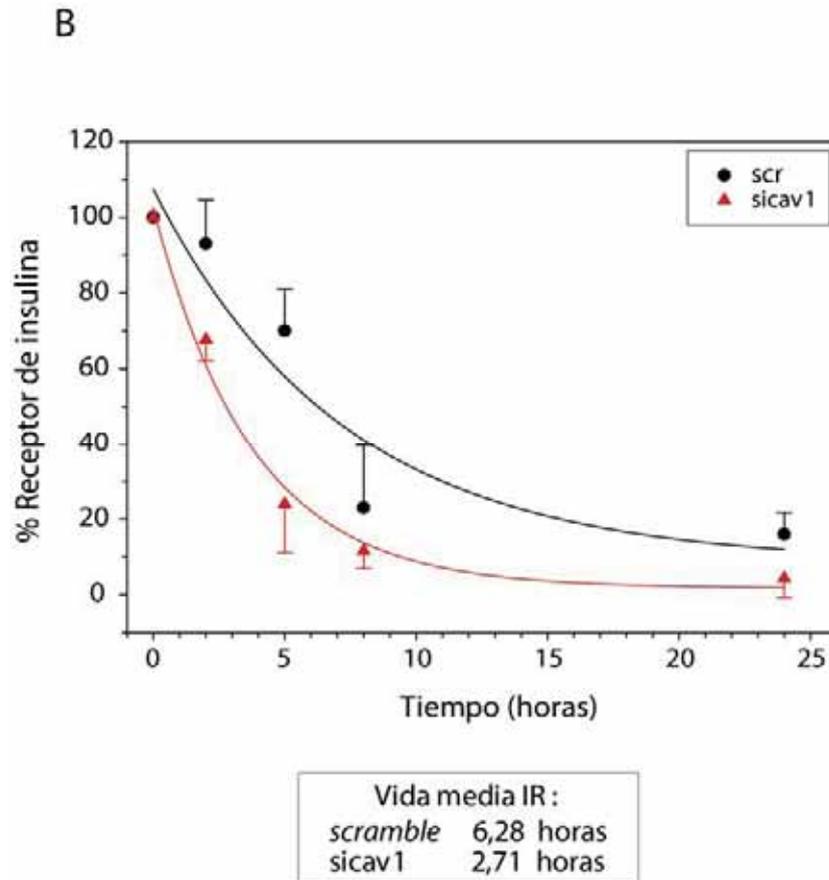
Como podemos observar en la figura 34, la expresión relativa de los mRNA de los distintos genes es similar en los adipocitos control y en los que carecen de caveolina-1 (excepto la expresión del mRNA de caveolina-1 que por definición, en los adipocitos siRNA está disminuido (ver capítulo 2 de los resultados). De manera que, la disminución que veíamos en la figura 31 de la expresión de las proteínas IR y GLUT4 en los adipocitos *sicav1* no es debida a una menor expresión de su mRNA.

### 4.3 Estudio de la estabilidad/vida media de las proteínas receptor de insulina (IR) y GLUT4

Tras los resultados obtenidos en el apartado anterior, concluimos que la disminución en la cantidad de proteína de IR y de GLUT4, respondía a diferencias en la síntesis y/o degradación de estas proteínas. Por esta razón decidimos realizar un ensayo de pulso y caza usando metionina marcada radiactivamente con  $^{35}\text{S}$ , para estudiar la vida media de estas proteínas en los adipocitos *scramble* y *sicav1* (ver apartado 8 de la sección Materiales y Métodos). Brevemente, los adipocitos se marcaron durante 12 horas con [ $^{35}\text{S}$ ]metionina, y la caza se extendió hasta 24 horas, en el caso de IR, y hasta 48 horas para el análisis de la vida media de GLUT4. Después de inmunoprecipitar las células con un anticuerpo que reconoce la subunidad  $\beta$  del receptor de insulina o un anticuerpo anti-GLUT4, los precipitados se cargaron en un gel SDS-PAGE. Se sometieron a autorradiografía los geles resultantes, tras ser fijados y secados.

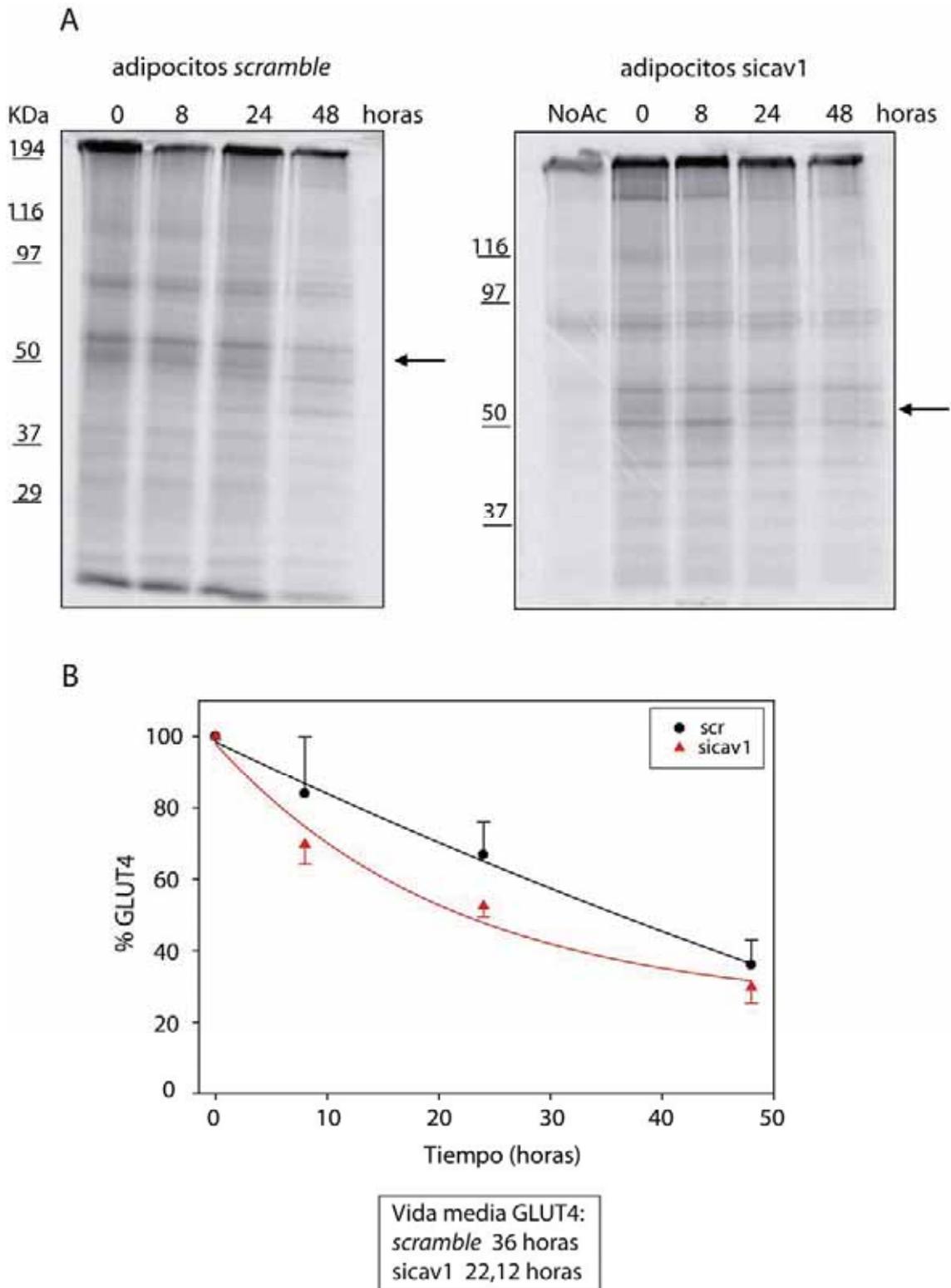
La figura 35 A muestra el resultado de la autorradiografía de un experimento representativo de pulso y caza para la proteína IR. En la figura 35 B aparece la cuantificación de la intensidad de las bandas de 4 experimentos independientes, expresada en porcentaje respecto al valor de la intensidad a tiempo cero. A partir de la curva de regresión generada por los puntos de esta gráfica ( $y = y_0 + a \cdot e^{-bx}$ ) calculamos la vida media del receptor de insulina en ambas líneas de adipocitos. En el caso de los adipocitos *scramble*, la vida media de la proteína IR es de aproximadamente 6,28 horas, mientras que en los adipocitos *sicav1* es de 2,71 horas. Estos resultados sugieren que la presencia de caveolina-1 es importante para la estabilidad del receptor de insulina.





**Figura 35. Vida media del receptor de insulina (IR) en los adipocitos *scramble* y *sicav1*.** Los adipocitos *scramble* y *sicav1* se marcaron con [<sup>35</sup>S]metionina durante 12 horas. Tras este periodo las células se lavaron y se incubaron en medio fresco durante los periodos indicados. Al final de cada incubación, se inmunoprecipitó IR como se describe en el apartado 8 de la sección Materiales y Métodos. Los inmunoprecipitados se sometieron a SDS-PAGE en condiciones reductoras y autorradiografía. (A) imagen de un autoradiograma representativo de 4 experimentos independientes. Las flechas indican las bandas correspondientes a la subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del receptor de insulina (B). La intensidad de cada una de las bandas ( $IR\alpha + IR\beta$ ) se cuantificó mediante el programa informático ImageQuant 5.2 y se expresó como porcentaje respecto al valor de intensidad inicial (tiempo 0).

Realizamos el mismo tipo de experimento (pulso y caza) para analizar la estabilidad de GLUT4 en los adipocitos *scramble* y *sicav1* (figura 36). De nuevo, estimamos la vida media de GLUT4 en los adipocitos *scramble* (36 horas) y *sicav1* (22,12 horas). La estabilidad de GLUT4 está disminuida en los adipocitos *sicav1*. Estos resultados indican, que la deficiencia en caveolina-1 en los adipocitos 3T3L1 afecta a la vida media de esta proteína.



**Figura 36. Vida media de GLUT4 en los adipocitos *scramble* y *sicav1*.** Los adipocitos *scramble* y *sicav1* se marcaron con [<sup>35</sup>S]metionina durante 12 horas. Tras este periodo las células se lavaron y se incubaron en medio fresco durante los periodos indicados. Al final de cada incubación, se inmunoprecipitó GLUT4 como se describe en el apartado 8 de la sección Materiales y Métodos. Los inmunoprecipitados se sometieron a SDS-PAGE en condiciones reductoras y autorradiografía. (A) imagen de un autoradiograma representativo de 3 experimentos independientes. Las flechas indican las bandas correspondientes a GLUT4. (B) La intensidad de cada una de las bandas se cuantificó mediante el programa informático ImageQuant 5.2 y se expresó como porcentaje respecto al valor de intensidad inicial (tiempo 0) como media ± SEM de 3 experimentos independientes. (NoAc indica que la inmunoprecipitación se realizó en las mismas condiciones pero sin anticuerpo).

## 5 Análisis de la acción de insulina

Se ha descrito ampliamente en la bibliografía el papel de las caveolas/*rafts* lipídicos como elementos reguladores en el control de la señalización de insulina (revisión Cohen et al., 2003a). Se ha descrito la localización del receptor de insulina en las caveolas de adipocitos (Gustavsson et al., 1999; Parpal et al., 2001) y la interacción del receptor de insulina con caveolina-1 (Couet et al., 1997a; Yamamoto et al., 1998; Nystrom et al., 1999). Además, a las caveolas/*rafts* lipídicos se les ha asignado un papel en la activación de la vía de señalización de la insulina que provoca el incremento del transporte de glucosa (Baumann et al., 2000; Chiang et al., 2001) (apartado 3.2.1.3 de la sección Introducción).

### 5.1 Análisis de la activación de las vías de señalización de la insulina

La translocación del transportador de glucosa GLUT4 a la membrana plasmática por acción de la insulina implica la activación de dos vías de señalización: la vía de señalización dependiente de PI3K y otra vía, denominada cbl/TC10 que se asocia con las caveolas/*rafts* lipídicos (Baumann et al., 2000; Chiang et al., 2001) (apartado 3.2.1.3 de la sección Introducción).

Brevemente, en la primera vía la activación de IR provoca la fosforilación de IRS-1 que entonces activa a PI3K, generando así los derivados fosfoinositídicos (PI3P) que activan a PDK-1 y a Akt (PKB). La activación de estas proteínas y de otras de la cascada (PKC $\zeta$ , p70 S6 quinasa) promueven finalmente la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática. En la segunda vía, la insulina estimula la fosforilación de c-Cbl para ello previamente requiere su translocación a *rafts* lipídicos/caveolas (donde intervienen las proteínas flotilina, CAP (*c-Cbl associated protein*) y APS). En estos dominios de la membrana c-Cbl activa a C3G (que es un *guanine nucleotide exchange factor*, GEF) que activa a la GTPasa TC10, implicada en la remodelación del citoesqueleto de actina cortical implicada en la translocación de GLUT4 (Kanzaki et al., 2001a; Omata et al., 2000; Kanzaki et al., 2002).

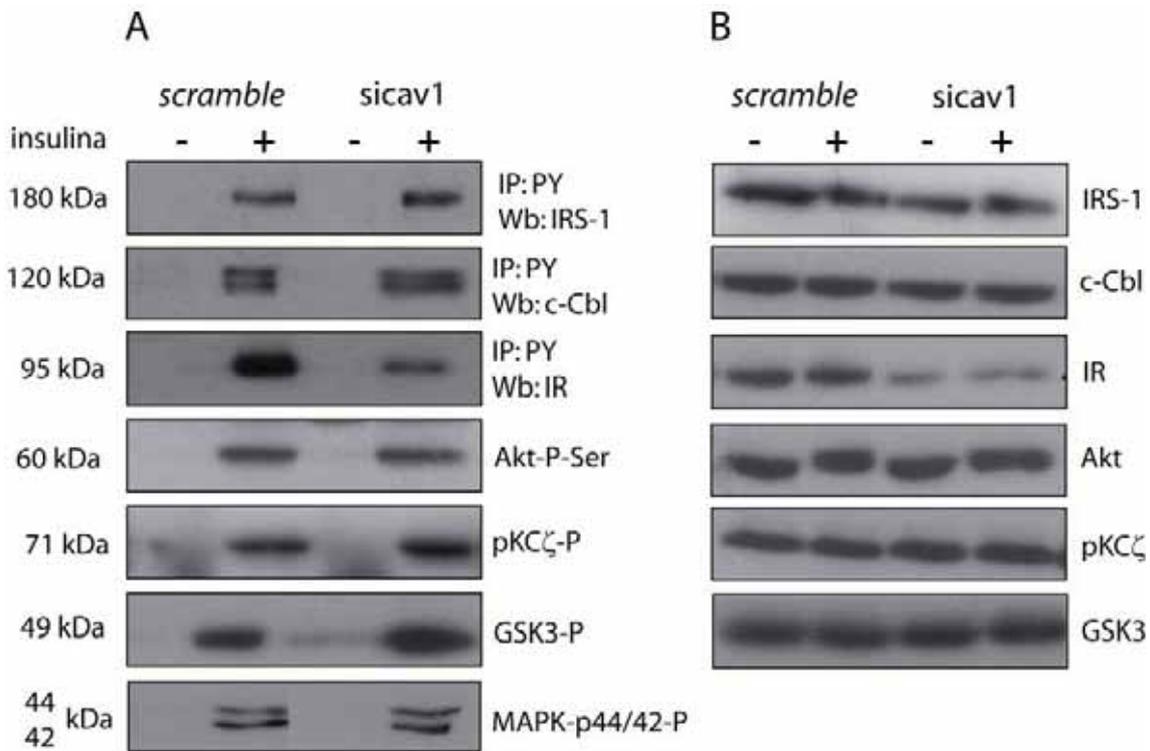
Nos planteamos estudiar en nuestro modelo de adipocitos deficientes en caveolina-1 la activación de estas vías de señalización de la insulina, analizando la fosforilación de algunos elementos importantes de la misma.

La activación de IR, la de IRS-1, y la de PI3K también actúa sobre otra vía de señalización metabólica implicada en la síntesis de glucógeno mediante la fosforilación de GSK-3 (glucógeno sintasa quinasa, que inhibe a la glucógeno sintasa, pero cuando GSK-3 está fosforilada deja de inhibir la glucógeno sintasa favoreciendo la síntesis de glucógeno). Además, la activación de IR e IRS-1 controla los efectos mitogénicos de la insulina a través de la quinasa MAPK. Por eso, también estudiamos el estado de fosforilación de estas vías analizando la fosforilación de GSK-3 y de MAPK.

Para realizar este experimento partimos de adipocitos 3T3L1 *scramble* o sicav1 ayunados durante dos horas. Posteriormente se añadió la insulina 100nM durante 5 minutos. Los adipocitos se homogeneizaron en un tampón que contenía Igepal 1% (ver apartado 7.2 de la sección Materiales y Métodos) para solubilizar las proteínas

Con el fin de cuantificar la fosforilación en tirosinas de IR, de c-Cbl y de IRS-1 inducida por la insulina, el sobrenadante obtenido tras la solubilización se inmunoprecipitó usando un anticuerpo anti-fosfotirosina. Los inmunoprecipitados obtenidos se analizaron por western blot usando un anticuerpo que reconoce la cadena  $\beta$  de receptor de insulina, un anticuerpo anti-Cbl o uno anti-IRS-1. El análisis de la activación de Akt, MAPK, PKC $\zeta$  y GSK-3, se realizó por

western blot a partir de lisados utilizando anticuerpos específicos: anti-Akt, anti-Akt-fosfofosforina473, anti-fosfo-MAPK p44/42, anti-fosfo-PKC $\zeta$  y anti-fosfo-GSK3 fosforilada (figura 37).

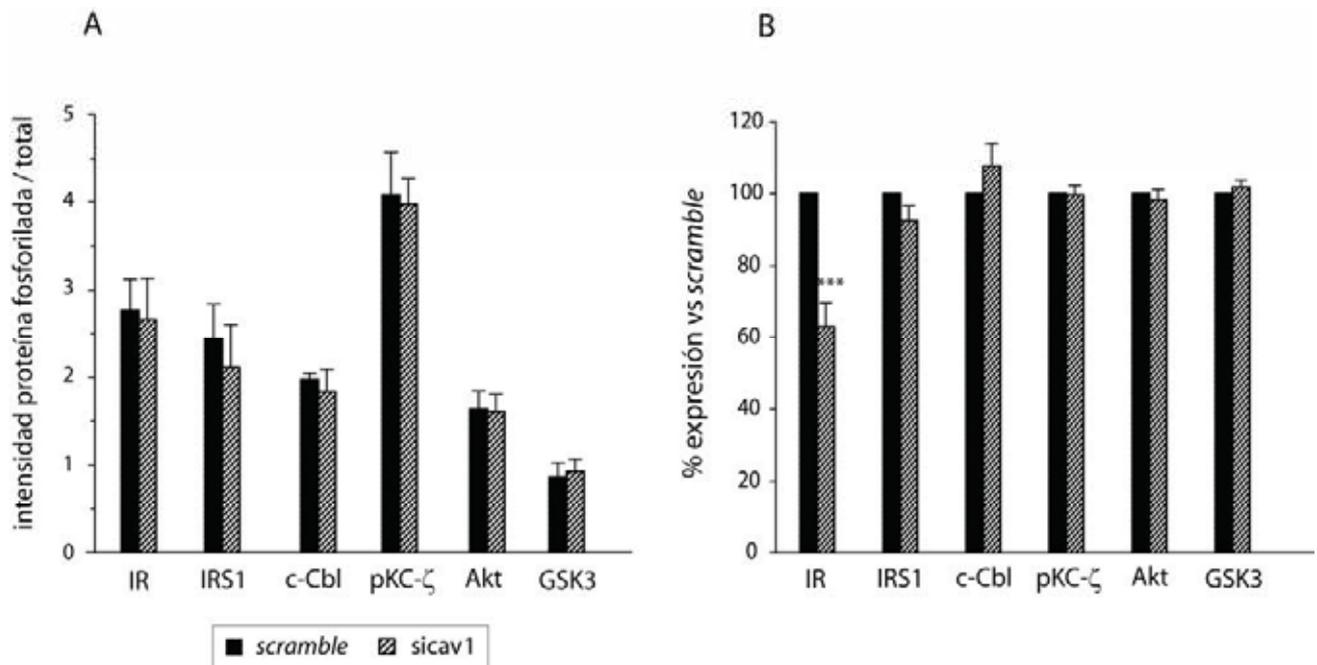


**Figura 37. Activación de las vía de señalización de insulina.** Adipocitos 3T3L1 scramble y deficientes en caveolina-1 (sicav1) crecidos en placas de 10 cm de diámetro fueron estimulados o no (+/-) con insulina 100nM durante 5 minutos antes de lisarlos en tampón A completo. 1mg del extracto celular fue usado para inmunoprecipitar con el anticuerpo anti-Phospho-tyrosine, la proteína inmunoprecipitada se analizó por western blot usando anticuerpos anti-IRS-1, anti-IR o anti-Cbl. Además, 100  $\mu$ g de cada extracto celular se analizaron por western blot usando anticuerpos anti-Akt-P-Ser, anti-fosfo-PKC $\zeta$ , anti-fosfo-GSK-3, o anti-fosfo-MapKinasa-p42/44.(figura 37 A) Para comprobar la cantidad total de estas proteínas 100  $\mu$ g de extracto celular de adipocitos scr y sica1 estimulados o no con insulina se analizaron por western blot usando anticuerpos anti-IRS1, anti-c-Cbl, anti-IR, anti-Akt, anti PKC $\zeta$ , y anti-GSK3 (figura 37 B)

Como podemos observar en la figura 37A, la única proteína de la cascada de señalización de la insulina en la que vemos diferencias en su fosforilación entre los adipocitos *scramble* y los *sicav1* es IR. A partir de los adipocitos deficientes en caveolina-1 conseguimos inmunoprecipitar menos cantidad de receptor de insulina fosforilado en tirosinas. Sin embargo, como ya vimos en el apartado 4.2.2, y como se muestra en la figura 37B, la expresión de IR es más baja también en estos adipocitos.

Así, si cuantificamos por densitometría, las bandas obtenidas en los western blot como los de la figura 37, para cada marcador podemos establecer un ratio entre la cantidad de proteína fosforilada y la cantidad total de proteína en los adipocitos *scramble* y *sicav1*, como se muestra en la figura 38 A, donde comprobamos que en ambas líneas de adipocitos la proporción de cada marcador de la vía de señalización, incluido IR, que se fosforila respecto al total, es similar.

En la figura 38 B se muestra la cuantificación de las bandas de los western blot como los de la figura 37 B, donde observamos que el porcentaje de expresión de cada proteína respecto a la expresión en los adipocitos *scramble*. Como habíamos visto en la figura 33, de nuevo aparece que los adipocitos sin caveolina-1 presentan una disminución del 40% en la expresión de IR.

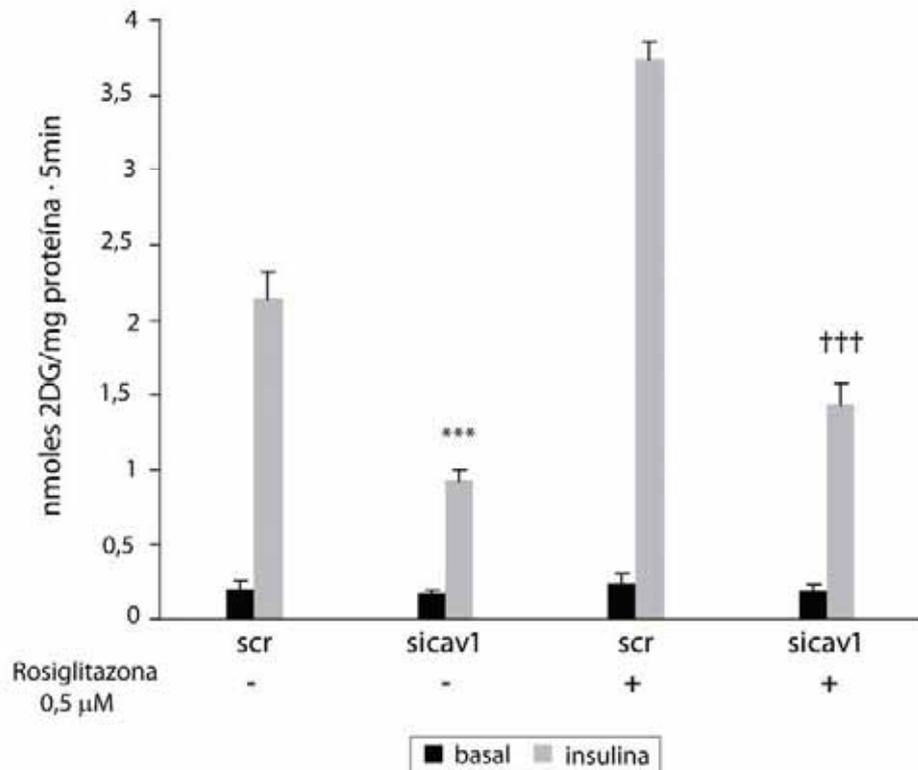


**Figura 38. Cuantificación de la activación de las vías de señalización de la insulina.** Se realizó la densitometría de las bandas que aparecieron en 9 western blot como los mostrados en la figura 37. En (A) aparece el ratio de la cuantificación de las bandas que muestran la fosforilación de cada proteína y las que muestran su expresión en la célula. En (B) aparece la cuantificación por densitometría de las bandas que muestran la expresión total de cada proteína en la célula en porcentaje respecto a la expresión en los adipocitos 3T3L1 *scramble*. \*\*\*  $P \leq 0,005$ ; probabilidad del test t-student.

## 5.2 Estimulación del transporte de glucosa por insulina

La activación de las vías de señalización de la insulina, estudiadas en el apartado anterior (5.1) lleva a la translocación de GLUT4 a la superficie de la membrana plasmática provocando la estimulación del transporte de glucosa. Nos planteamos, por tanto, analizar la estimulación del transporte de glucosa en los adipocitos deficientes en caveolina-1.

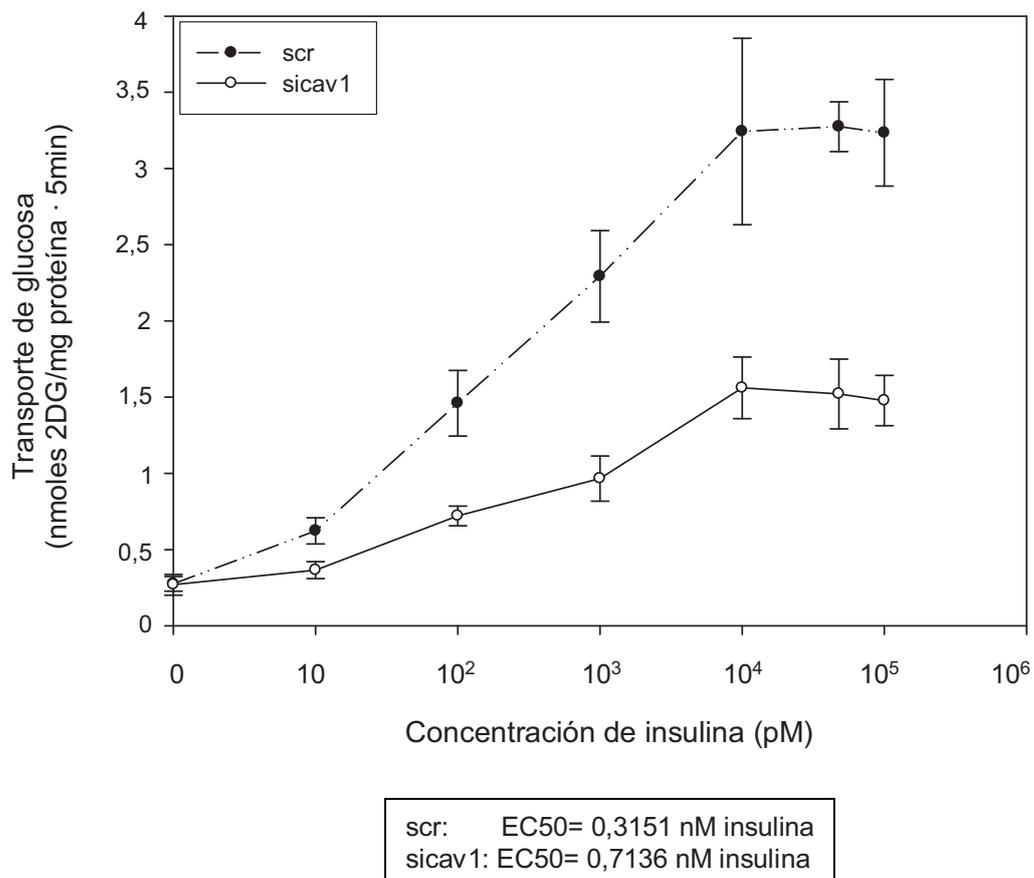
De esta manera, se midió el transporte de glucosa basal y estimulado por insulina (30 minutos a una concentración 100nM) durante 5 minutos, en adipocitos *scramble* y *sicav1*. Además, como hicimos en el apartado 4.1.3, también realizamos este experimento usando adipocitos que habían sido diferenciados en presencia de rosiglitazona 0,5  $\mu$ M (ver apartado 4.1.3). Como hemos descrito en el apartado 4.1.4 de esta sección y en el apartado 3.1 de la sección Introducción, la rosiglitazona es un ligando sintético de PPAR $\gamma$  que se ha usado para activar eficientemente el programa de diferenciación adipocitaria (Kletzien *et al.*, 1992; Lehmann *et al.*, 1995; Willson *et al.*, 1996; Gimble *et al.*, 1996).



**Figura 39. Transporte de glucosa en condición basal y estimulado por insulina en adipocitos 3T3L1 scr y sicav1.** Los adipocitos 3T3L1, diferenciados con el cóctel habitual (-) o añadiéndole rosiglitazona 0,5 μM al cóctel, se incubaron 30 minutos con (barras negras; ins) o sin (barras negras; basal) insulina 100nM. Se midió el transporte de 2-deoxi-glucosa-<sup>3</sup>H (2DG) durante 5 minutos. En la figura 36, se muestra la media del transporte de glucosa de 6 experimentos independientes \*\*\* P≤0,005; probabilidad del test t-student respecto a los adipocitos scr estimulados por insulina; +++ P≤0,005 probabilidad del test t-student respecto a los adipocitos scr estimulados por insulina diferenciados con rosiglitazona.

En la figura 39 podemos ver que ambos adipocitos (*scramble* y *sicav1*) responden a la insulina estimulando el transporte de glucosa. Sin embargo, los adipocitos deficientes en caveolina-1 presentan una disminución de aproximadamente el 50% del transporte de glucosa estimulado por insulina, ocurre lo mismo cuando forzamos la diferenciación añadiendo al cóctel habitual rosiglitazona 0,5 μM (ligando artificial de PPAR<sub>γ</sub>).

Analizamos también cómo era la dosis-respuesta de la estimulación del transporte de glucosa por insulina en estos adipocitos. Para ello utilizamos distintas concentraciones de insulina. (figura 40). A partir de las curvas obtenidas se calculó la concentración de insulina a la que se consigue la mitad del transporte máximo de glucosa (EC50), para ello usamos el programa informático GraphPad. Como se puede ver en la figura 40, la EC50 de los adipocitos *scramble* es aproximadamente la mitad que la de los adipocitos *sicav1* (esta diferencia entre las EC50 es estadísticamente significativa aplicando el test t-student). Es decir, los adipocitos *scramble* necesitan menos (un 56% menos) concentración de insulina que los adipocitos *sicav1* para alcanzar la mitad del transporte máximo de glucosa.



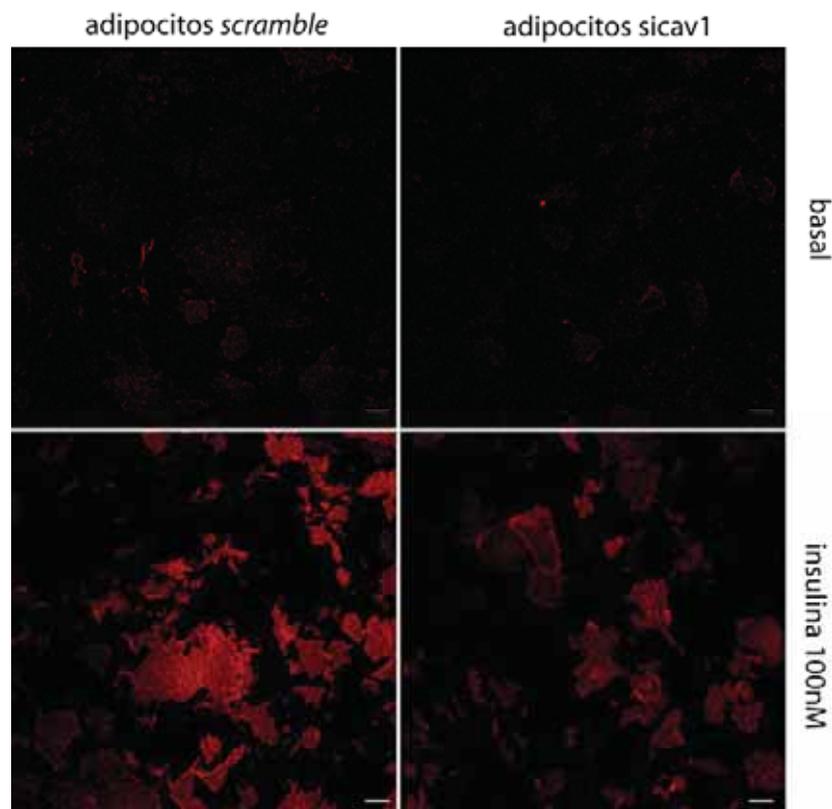
**Figura 40. Dosis-respuesta del transporte de glucosa ante distintas concentraciones de insulina en adipocitos *scramble* y *sicav1*.** Los adipocitos 3T3L1 *scr* y *sicav1*, se incubaron 30 minutos con distintas concentraciones de insulina (10 pM, 100pM, 1nM, 10nM, 50nM y 100nM) y sin insulina, durante 30 minutos, posteriormente se midió el transporte de 2-deoxi-glucosa-<sup>3</sup>H (2DG) durante 5 minutos. En la figura se muestra la media de 6 experimentos independientes en nmoles de glucosa transportados en 5 minutos/ mg de proteína. A partir de las curvas se calculó las concentraciones de insulina EC50, usando el programa informático “Graphpad”.

### 5.3 Translocación de GLUT4 a la membrana plasmática

Como se ha descrito en el apartado 3.2.1.3 de la sección Introducción, la estimulación del transporte de glucosa por la insulina (analizado en el apartado 5.2) se debe a que la insulina provoca la translocación de GLUT4 desde compartimentos intracelulares a la superficie de la membrana plasmática. Nos planteamos, por tanto, analizar cómo era esta translocación de GLUT4 en los adipocitos control y deficientes en caveolina-1.

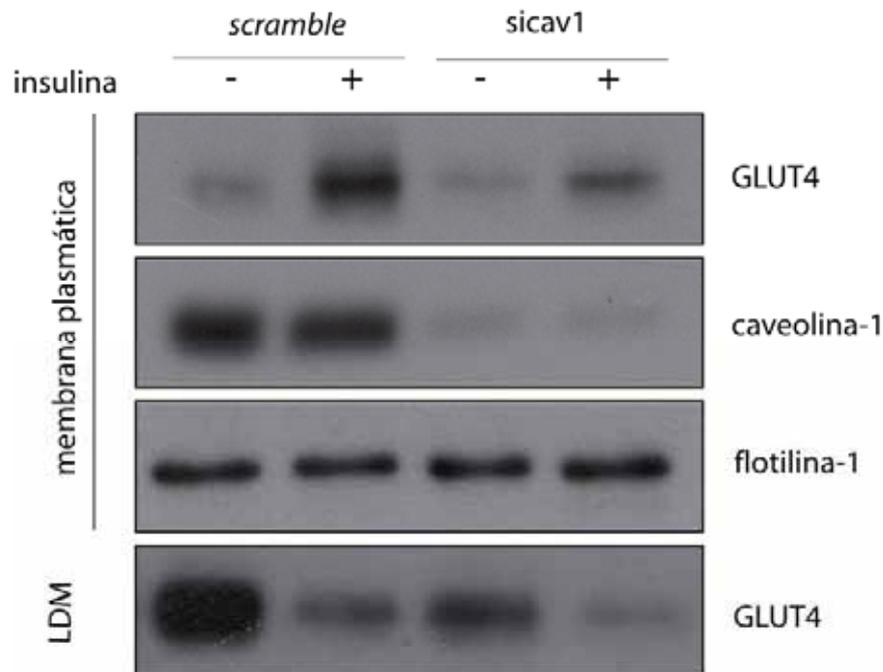
Para ello, en primer lugar analizamos la localización de GLUT4 en la membrana plasmática en estado basal y estimulado por insulina 100nM durante 30 minutos, mediante inmunolocalización de GLUT4 sobre fragmentos de membrana plasmática (PML, obtenidos como se indica en el apartado 4.1 de la sección Materiales y Métodos).

En la figura 41 podemos ver que la translocación de GLUT4 a la superficie de la membrana plasmática en presencia de insulina ocurre tanto en adipocitos *scramble* como en los *sicav1*. La intensidad de la señal de GLUT4 en estos últimos, es menor, lo cual concuerda con el menor transporte de glucosa de estos adipocitos (apartado 5.2) y con la menor expresión de esta proteína en los adipocitos *sicav1* (apartado 4.2.2).



**Figura 41. Translocación de GLUT4 a la membrana plasmática estimulada por insulina en adipocitos *scramble* y *sicav1*.** Los adipocitos *scramble* y *sicav1* crecidos en cubreobjetos se incubaron en presencia o en ausencia (basal) de insulina 100nm durante 30 minutos. Posteriormente se procesaron para obtener fragmentos de membrana plasmática, se fijaron con paraformaldehído 3%, y se realizó la inmunolocalización de GLUT4. Escala 25 $\mu$ m

En paralelo, para confirmar estos resultados, realizamos un fraccionamiento subcelular (apartado 6.2 de la sección Materiales y Métodos) de adipocitos *scramble* y *sicav1* estimulados o no con insulina 100nM durante 30 minutos para obtener las fracciones de membrana plasmática y de LDM (microsomos de baja densidad), en esta última fracción se localiza el compartimento intracelular de GLUT4.



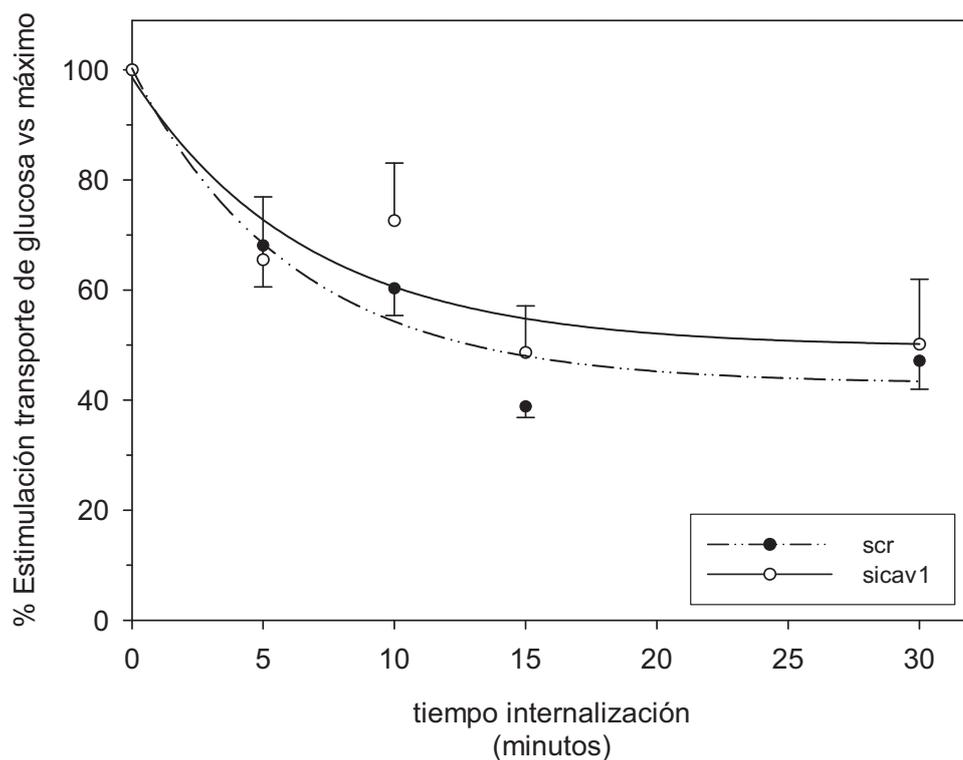
**Figura 42. Translocación de GLUT4 a la membrana plasmática desde la fracción de LDM en adipocitos *scramble* y *sicav1*.** Los adipocitos *scramble* y *sicav1* ayunados durante 2 horas se incubaron durante 30 minutos en ausencia (-) o en presencia de insulina 100nM (+). Posteriormente se realizó el fraccionamiento subcelular como se indica en el apartado 6.2 de la sección Materiales y Métodos. La misma cantidad de proteína (15  $\mu$ g) de las fracciones de membrana plasmática y de LDM se usó para realizar un western blot usando anticuerpos anti-GLUT4, anti-caveolina-1, y anti- flotilina-1

En la figura 42 podemos observar como efectivamente, en presencia de insulina GLUT4 se moviliza desde el compartimento intracelular localizado en la fracción de las LDM hasta la membrana plasmática, y que esto ocurre tanto en adipocitos *scramble* como en los *sicav1*. De nuevo, comprobamos como la cantidad total de GLUT4 en los adipocitos *sicav1* es menor que en los adipocitos control.

## 5.4 Internalización de GLUT4 durante la reversión de la acción de la insulina

Como hemos visto la insulina provoca un aumento de la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática desde compartimentos intracelulares y, por tanto, un incremento en el transporte de glucosa. Esto se consigue fundamentalmente mediante el aumento de la exocitosis de GLUT4, pero también por una disminución en la tasa de endocitosis de GLUT4 desde la membrana plasmática. Igualmente, durante la reversión de la acción de la insulina, los adipocitos recuperan el estado basal, y para ello ha de ocurrir la endocitosis de GLUT4 desde la membrana plasmática hacia los compartimentos intracelulares (Blot et al., 2006; Martin et al., 2006). Se ha descrito ampliamente en la bibliografía la importancia de los *rafts* lipídicos/caveolas para la eficiente internalización de GLUT4 (Ros-Baró et al., 2001; Shigematsu et al., 2002).

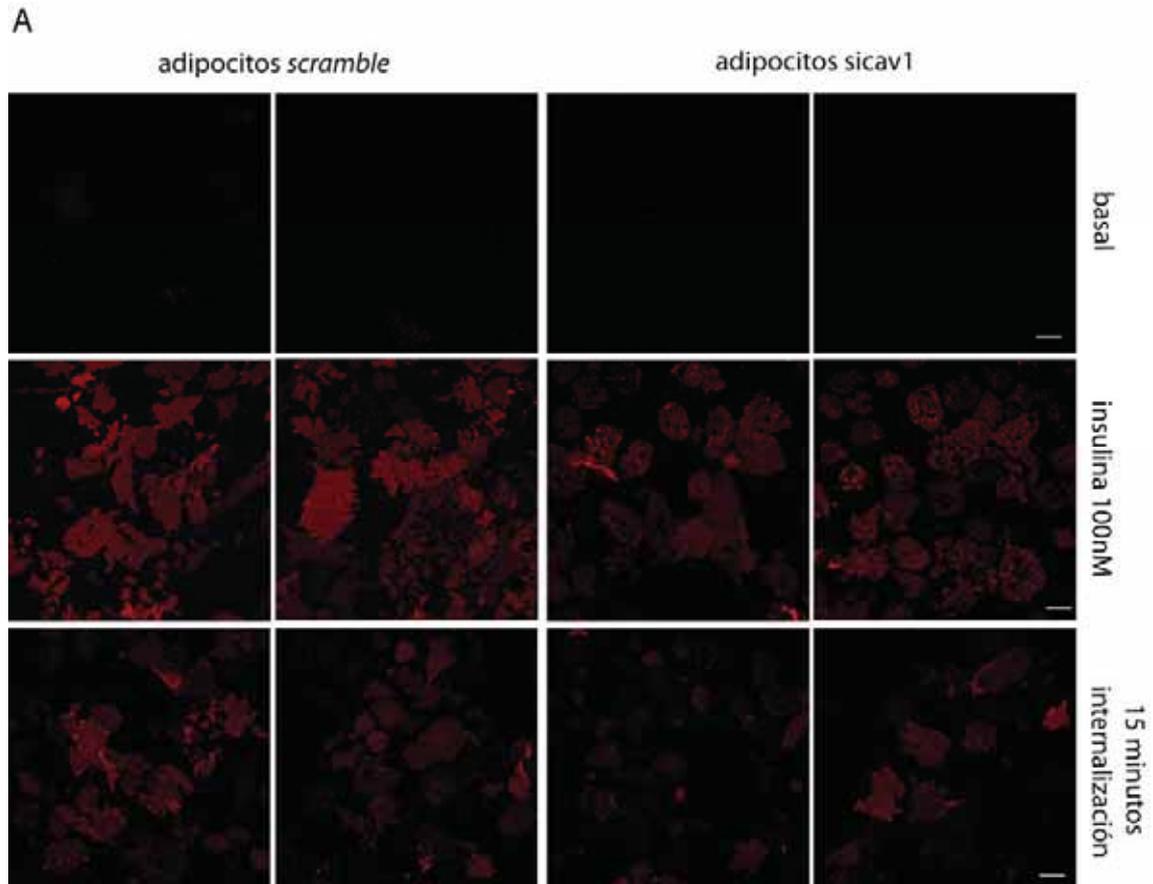
Para analizar si caveolina-1 es necesaria en la endocitosis de GLUT4 durante la reversión de la acción de la insulina, en primer lugar se cuantificó la disminución del transporte de 2-deoxi-glucosa a diferentes tiempos después de eliminar la insulina del medio (mediante lavados con el tampón Krebs-Ringer-MES (pH6)(ver apartado 5.2 de la sección Materiales y Métodos).

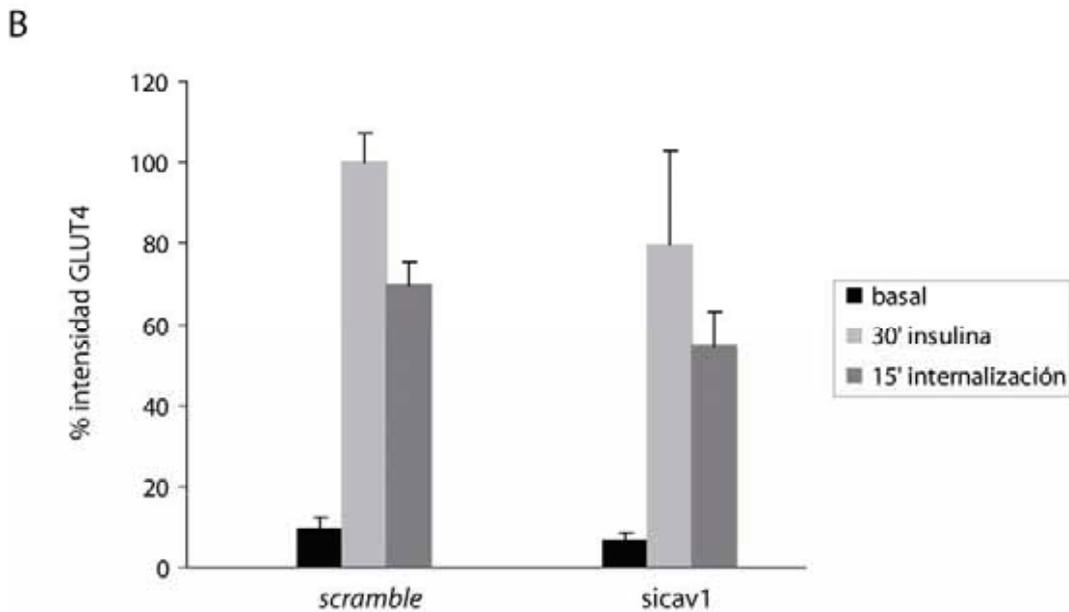


**Figura 43. Transporte de glucosa durante la reversión de la acción de la insulina en adipocitos *scramble* y *sicav1*.** Los adipocitos *scramble* y *sicav1* se incubaron durante 30 minutos con insulina 100nM. Después se eliminó la insulina del medio realizando 3 lavados con el tampón Krebs-Ringer-MES pH 6.0. Después de los lavados las células se incubaron durante 5, 10, 15 o 30 minutos con el tampón Krebs-Ringer-MES- pH6 0,2% BSA, y justo antes de empezar la medida del transporte de 2-deoxi-glucosa se cambió el medio por el tampón Krebs-Ringer-Hepes- pH 7,4 0,2% BSA. El transporte de glucosa se midió durante 5 minutos. Los valores se expresan como porcentaje respecto al transporte máximo estimulado por la insulina antes de comenzar la reversión de la acción de la insulina (tiempo cero).

Como se puede observar en la figura 43, aunque la reversión de la acción de la insulina parece ser un poco más lenta en los adipocitos *sicav1*, (en cada momento en que se midió el transporte de glucosa después de haber eliminado la insulina del medio, el porcentaje del transporte de glucosa respecto el máximo, es ligeramente mayor en los adipocitos *sicav1*), las diferencias no son estadísticamente significativas, por lo que podemos concluir que ambos adipocitos presentan un perfil de internalización de GLUT4 durante la reversión de la acción de la insulina similar.

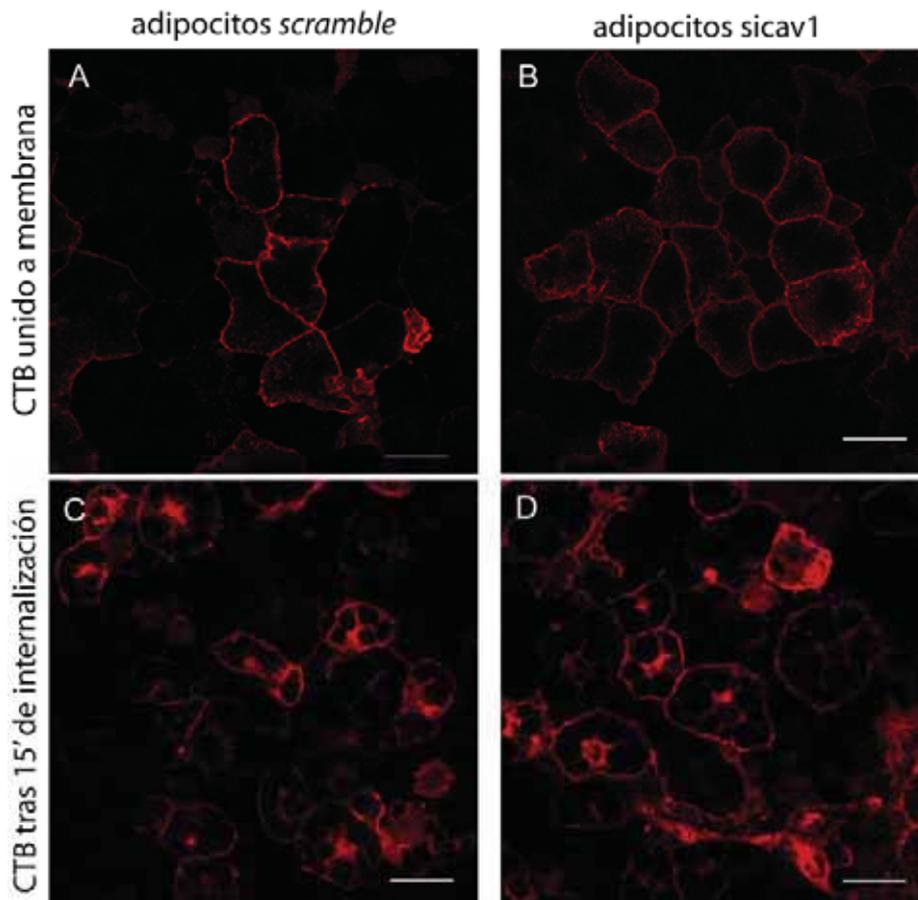
En segundo lugar, para analizar el efecto de la ausencia de caveolina-1 sobre la endocitosis de GLUT4 durante la reversión de la acción de la insulina, se partió de fragmentos de membrana plasmática procedentes de adipocitos *scramble* y *sicav1*, en estado basal, después de 30 minutos de estimulación con insulina 100nM y después de 15 minutos de reversión de la acción de la insulina. Posteriormente se realizó una inmunolocalización de GLUT4, y se capturaron las imágenes mediante microscopía confocal (figura 44 A). Se midió la cantidad de GLUT4 en la membrana plasmática cuantificando la intensidad de los píxeles por superficie analizada de cada célula, de un total de 64 imágenes captadas en 4 experimentos independientes. Se usó el programa informático Leica®. En la figura 44 B, aparece la cuantificación las intensidades de GLUT4 expresadas en porcentaje respecto a la intensidad de las muestras correspondientes a los adipocitos *scramble* después de la estimulación con la insulina (antes de comenzar la internalización). Cuando calculamos, tanto para adipocitos *scramble* como para los *sicav1*, el porcentaje de GLUT4 que queda en la membrana tras los 15 minutos de reversión de la acción de la insulina, respecto a la cantidad máxima de GLUT4 en la membrana, obtuvimos para los adipocitos *scramble* un 66,7% de GLUT4 en la membrana y para los *sicav1* un 67,7%. Observamos, por tanto, que la carencia de caveolina-1 de los adipocitos *sicav1* no afecta a este porcentaje de internalización.





**Figura 44. Internalización de GLUT4 durante la reversión de la acción de insulina en adipocitos *scramble* y *sicav1*.** Los adipocitos scr y sicav1 crecidos en cubreobjetos y ayunados durante dos horas se incubaron en ausencia (basal) o en presencia de insulina 100nM durante 30 minutos. Posteriormente, a algunos de estos cubreobjetos se les eliminó la insulina del medio lavando tres veces con el tampón Krebs-Ringer-MES pH 6.0, después las células se incubaron durante 15 minutos con el tampón Krebs-Ringer-MES- pH6 0,2% BSA. Inmediatamente después se procesaron para obtener fragmentos de membrana plasmática, se fijaron con paraformaldehído 3% y se realizó una inmunolocalización de GLUT4 (figura 44 A). Las imágenes se tomaron en las mismas condiciones por lo que las intensidades de los píxeles son comparables. Escala 25 $\mu$ m. En la figura 44B, aparece la cuantificación de las intensidades de GLUT4 expresadas en porcentaje respecto a la intensidad de las muestras correspondientes a los adipocitos *scramble* después de la estimulación con la insulina (antes de comenzar la internalización). Aparece también en la gráfica el porcentaje de GLUT4 que queda en la membrana plasmática tras la internalización, en cada grupo de adipocitos, respecto a la cantidad de GLUT4 tras los 30 minutos de incubación con la insulina.

Una vez habíamos comprobado que la carencia en caveolina-1 no afectaba a la internalización de GLUT4 durante la reversión de insulina, quisimos comprobar si caveolina-1 es necesaria para otros procesos de endocitosis dependiente de caveolas/*rafts* lipídicos. Para ello analizamos la endocitosis de la toxina colérica, ya que se sabe que la cadena B de la toxina colérica (CTB), después de unirse al gangliósido GM1, en adipocitos, es internalizada a través de caveolas/*rafts* lipídicos (Orlandi *et al.*, 1998). En la figura 45 vemos como no aparecen diferencias en la internalización de la toxina colérica entre adipocitos *scramble* y los *sicav1*.

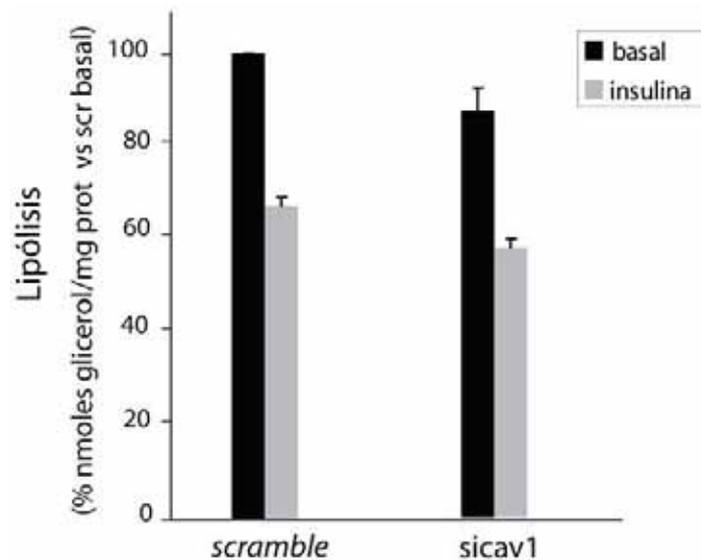


**Figura 45. Internalización de la toxina colérica en adipocitos *scramble* y *sicav1*.** Adipocitos *scramble* y *sicav1* crecidos en cubreobjetos y ayunados, se incubaron con la cadena B de la toxina colérica conjugada al fluorocromo FITC (CTB-FITC) durante 30 minutos a 4°C. Durante este periodo la toxina se une a la membrana plasmática. Posteriormente, las células se lavaron para eliminar la toxina colérica no unida a membrana y se dejaron a 37°C durante 15' para permitir la internalización de la toxina. Las células se fijaron en paraformaldehído y se capturaron imágenes usando un microscopio confocal. Las imágenes se tomaron en las mismas condiciones por lo que las intensidades de los píxeles son comparables.

## 5.5 Análisis de la implicación de la caveolina-1 en otras acciones de la insulina

Nos planteamos analizar otras acciones de la insulina que pudieran depender de la vía de señalización del receptor de insulina asociada a caveolas/*rafts* lipídicos, y que no estuviesen relacionadas con movimientos de vesículas, para diferenciar estas acciones de la insulina de la vía de señalización descrita por Pessin y Saltiel donde TC10 es el efector final involucrado en la remodelación del citoesqueleto de actina que participa en el movimiento de vesículas que lleva a la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática. Estudiamos dos efectos importantes que tiene la insulina sobre el metabolismo de los adipocitos, que son: la inhibición de la lipólisis y la estimulación de la lipogénesis.

De esta manera, se midió la tasa de lipólisis valorando los nmoles de glicerol liberados al medio/mg de proteína (ver apartado 5.4.1 de la sección Materiales y Métodos) durante 1 hora (tras dos horas de ayuno) en presencia de adrenalina 1nM y estimulados (insulina) o no (basal) con insulina 100nM, en adipocitos 3T3L1 *scramble* y *sicav1*. Todas las células fueron tratadas con adrenalina 1nM, que activa la lipólisis aproximadamente un 27% pero es una dosis suficientemente baja como para que la insulina, a la concentración de 100nM, siga ejerciendo su función inhibitoria de la lipólisis (de esta manera se aumenta la diferencia entre la lipólisis basal y la inhibida por insulina ya que si no, las diferencias son pequeñas y es difícil ver posibles diferencias entre los adipocitos *scramble* y *sicav1*).

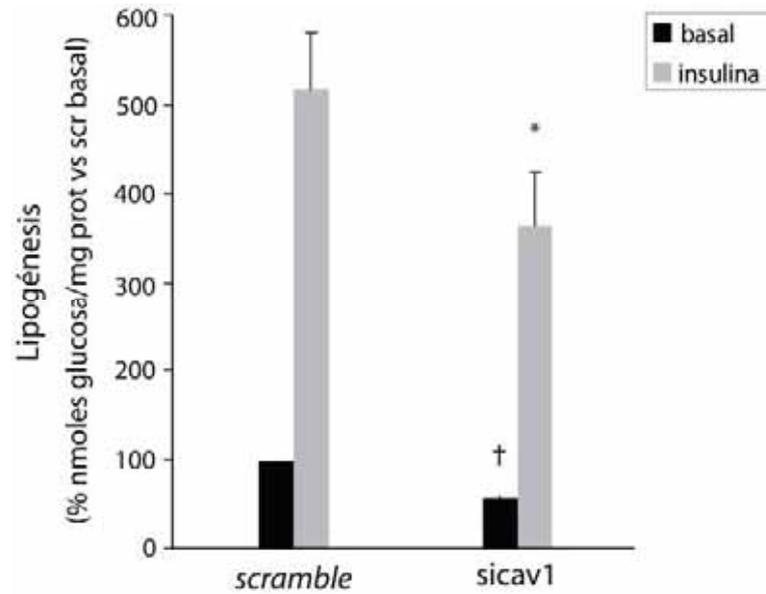


**Figura 46. Medida de la lipólisis en condiciones basal e inhibida por insulina en adipocitos *scramble* y *sicav1* bajo estimulación por adrenalina 1nM.** Los adipocitos scr y *sicav1* ayunados durante 2 horas se incubaron 1 hora, en presencia de adrenalina 1nM, con (insulina) o sin (basal) insulina 100nM. Se midió la lipólisis realizada como los nmoles de glicerol liberados al medio en 1 hora. En la figura aparecen las medias de 4 experimentos independientes, normalizadas *versus* la de los adipocitos scr en condición basal (1,7  $\mu$ moles glicerol/mg proteína),

En la figura 46 vemos como la lipólisis en los adipocitos deficientes en caveolina-1 es ligeramente inferior a la de los adipocitos *scramble* tanto en condición basal como inhibida por insulina, de tal manera que el porcentaje de inhibición de la lipólisis provocado por la insulina es semejante en ambos grupos de adipocitos (12,7% en adipocitos *scramble* y 14% en adipocitos *sicav1*)

Para analizar la estimulación que produce la insulina sobre la lipogénesis, se midió la cantidad (nmoles) de glucosa incorporada a lípido, mediante el marcaje con  $^{14}\text{C}$  de la glucosa precursora (ver apartado 5.3 de la sección Materiales y Métodos) durante 1 hora y 30 minutos en presencia (ins) o ausencia (basal) de insulina 100nM, en adipocitos *scramble* y *sicav1*

Vemos que tanto la lipogénesis basal como la estimulada con insulina es menor en los adipocitos *sicav1* (figura 47), aunque la estimulación que provoca la insulina sobre la lipogénesis en los adipocitos *sicav1* (6,15 veces) es ligeramente superior a la de los adipocitos control (*scr*) (5,3 veces).



**Figura 47. Medida de la lipogénesis en condiciones basal y estimulada por insulina en adipocitos *scramble* y *sicav1*.** Los adipocitos 3T3L1 se ayunaron durante 2 horas y posteriormente se incubaron 1 hora y 30 minutos, sin (basal) o con insulina 100nM. Se midió la lipogénesis realizada como los nmoles de glucosa incorporada a lípido en 1 hora y 30'. El valor medio de la lipogénesis basal en la condición control fue de 20 nmoles de glucosa/pozo de placa *6well* (ver apartado 5.3 de la sección Materiales y Métodos) En la figura 47 aparecen las medias de 3 experimentos independientes, normalizadas *versus* la condición basal de adipocitos *scramble*. \*  $P \leq 0,05$ , probabilidad del test t-student respecto el grupo *scramble* estimulado por insulina. †  $P \leq 0,05$ , probabilidad del test t-student respecto el grupo *scramble* basal.

## 6 Estudio del papel de la caveolina-1/ caveolas en el metabolismo lipídico del adipocito

La caracterización del fenotipo de los ratones KO de caveolina-1 (*cav1*<sup>-/-</sup>) relacionó por primera vez caveolas y caveolina-1 con la homeostasis lipídica y obesidad (Razani *et al.*, 2002a)(apartado 2.4.7 de la sección Introducción). Los ratones *cav1*<sup>-/-</sup> de un año tienen un peso corporal menor que sus controles salvajes, esta diferencia de peso corporal es debida a la reducción del tejido adiposo. Además, los adipocitos, que no presentan caveolas, tienen un menor diámetro y están poco diferenciados. Los ratones *cav1*<sup>-/-</sup> presentan resistencia a la aparición de obesidad inducida por la dieta rica en lípidos y tienen altos niveles de TAG y ácidos grasos (*fatty acid*, FA) circulantes (igual que ocurre con los ratones KO para perilipina (Tansey *et al.*, 2001) sugiriendo una relación entre la expresión de caveolina-1 y la regulación lipídica. Estos ratones son resistentes a la insulina y presentan una disminución de aproximadamente el 90% en la expresión de IR en el tejido adiposo (Cohen *et al.*, 2003b).

### 6.1 Transporte de ácidos grasos a través de la membrana plasmática

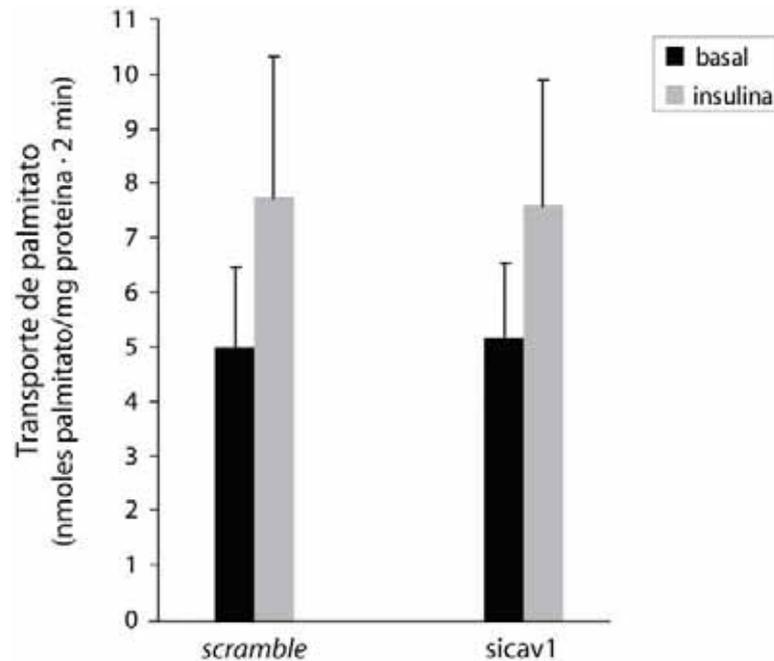
Los adipocitos humanos no tienen gran capacidad para sintetizar ácidos grasos *de novo*; de manera que gran parte de los TAG se sintetizan a partir de los ácidos grasos provenientes de la hidrólisis de los quilomicrones o lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) mediada por la LPL (*lipoprotein lipase*). Los ácidos grasos circulantes liberados por acción de las lipasas se ligan a albúmina y son captados por los adipocitos donde son esterificados a glicerol formando TAG y almacenados en las gotas lipídicas (LD). Este proceso debe ser muy eficiente ya que los ácidos grasos libres actúan como detergentes y su acumulación puede disolver la membrana plasmática provocando la lisis celular (Stralfors, 1990).

La captación de ácidos grasos de cadena larga (LCFA) en los adipocitos es predominantemente un proceso mediado por transportadores, ocurriendo el 90% de forma saturable (Stump *et al.*, 2001). Se ha relacionado a los *rafts* lipídicos/caveolas con este proceso, ya que el tratamiento con ciclodextrina, que desestructura los *rafts* lipídicos, reduce la captación de LCFA (Pohl *et al.*, 2004b) Además, existen evidencias sólidas que indican que dos proteínas de membrana, FAT/CD36 y FATP1, facilitan la captación de LCFA. Ambas incrementan la captación de ácidos grasos cuando se sobreexpresan en diferentes líneas celulares y su expresión se induce durante la diferenciación de fibroblastos a adipocitos (Schaffer *et al.*, 1994; Stahl *et al.*, 2002; Stahl, 2004; Abumrad *et al.*, 1991). FAT/CD36, que se ha localizado en caveolas (Souto *et al.*, 2003; Pohl *et al.*, 2004b), es el responsable de la captación de ácidos grasos dependiente de caveolas, esta captación es independiente de la endocitosis de caveolas (Pohl *et al.*, 2005). Además, también se ha implicado en el transporte de ácidos grasos a la caveolina-1 y a FABP (*fatty acid binding protein*) (Trigatti *et al.*, 1999; Pohl *et al.*, 2005; Meshulam *et al.*, 2006).

Teniendo en cuenta estos antecedentes nos planteamos analizar el transporte de LCFA en los adipocitos *sicav1*.

Para ello medimos el transporte de ácido palmítico marcado con <sup>14</sup>C, durante 2 minutos en los adipocitos *scramble* y *sicav1* en estado basal (tras dos horas de ayuno) o después de la estimulación con insulina 100nM durante 30 minutos.

Como podemos ver en la figura 48, la deficiencia de caveolina-1 no modifica la capacidad de los adipocitos de transportar palmitato ni en condiciones basales ni estimulados por insulina.



**Figura 48. Transporte de palmitato en adipocitos *scramble* y *sicav1*.** Los adipocitos 3T3L1 *scramble* (scr) y deficientes en caveolina-1 (*sicav1*) ayunados durante 2 horas se estimularon o no (basal) con insulina 100nM durante 30 minutos. Posteriormente se midió el transporte de [ $^{14}$ C]palmitato durante 2 minutos. (ver apartado 5.5 de la sección Materiales y Métodos) En la figura se muestra la media 5 experimentos independientes en nmoles de palmitato transportados en 2 minutos/mg de proteína

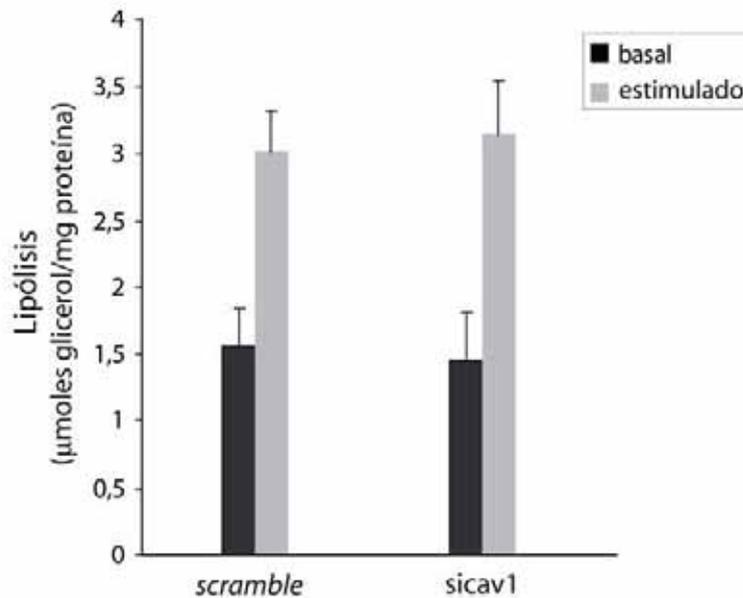
## 6.2 Movilización del *pool* de triglicéridos (TAG) en adipocitos 3T3L1

Existen algunas evidencias que muestran una relación entre caveolina-1 y la lipólisis en los adipocitos. Así, el ayuno en ratones induce la expresión de caveolina-1 en el tejido adiposo al mismo tiempo que provoca el aumento de la movilización de TAG y de los niveles de ácidos grasos séricos (Cohen *et al.*, 2004a). Además, existe una evidencia de la presencia de caveolina-1 en los LDs de adipocito 3T3L1 activados lipolíticamente (Brasaemle *et al.*, 2004). También se ha demostrado que caveolina-1 interactúa negativamente con PKA (*AMPc dependent protein kinase*), enzima fundamental en la activación de la lipólisis estimulada por agonistas  $\beta$ -adrenérgicos (Razani *et al.*, 1999) (apartado 3.4.3 de la sección Introducción). Sin embargo, también se ha descrito que los ratones *cav1*<sup>-/-</sup> presentan menor respuesta lipolítica a las catecolaminas acompañada de una menor fosforilación de perilipina, sugiriendo que caveolina-1 actúa como factor acoplador necesario para la fosforilación de perilipina mediada por PKA (Cohen *et al.*, 2004a).

### 6.2.1 Actividad lipolítica basal y estimulada por efectores $\beta$ -adrenérgicos

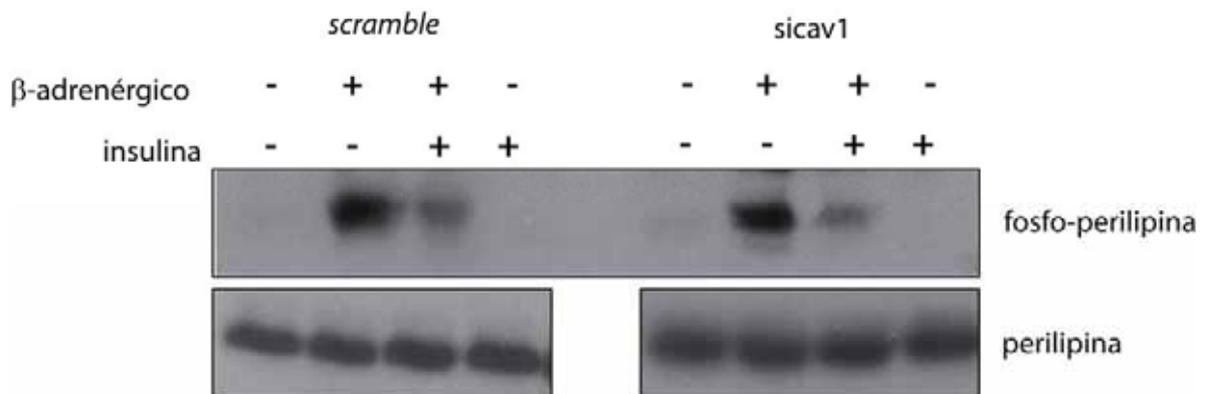
Según estos antecedentes quisimos analizar la actividad lipolítica basal y la estimulada por efectores  $\beta$ -adrenérgicos (isoproterenol 10  $\mu$ M y con IBMX 0,5 mM) midiendo la cantidad de glicerol liberada al medio mediante un método colorimétrico (*free glycerol reagent*; Sigma)(apartado 5.4.2 de la sección Materiales y Métodos).

En la figura 49 observamos que la deficiencia de caveolina-1 de los adipocitos sicav1 no afecta a su capacidad lipolítica ni en condición basal ni estimulados con los efectores  $\beta$ -adrenérgicos isoproterenol 10 $\mu$ M e IBMX 0,5mM.



**Figura 49. Medida de la lipólisis de adipocitos scr y sicav1 en condiciones basal y estimulada con efectores  $\beta$ -adrenérgicos.** Los adipocitos scr y sicav1 después de 2 horas de ayuno se estimularon o no (basal) con isoproterenol 10 $\mu$ M e IBMX 0,5mM durante 30 minutos. Se midió el glicerol liberado al medio mediante un ensayo colorimétrico (*free glycerol reagent*, Sigma) como los nmoles de glicerol liberados / mg de proteína

Por último quisimos comprobar el estado de activación de los sustratos de la PKA usando los lisados de adipocitos estimulados o no con efectores  $\beta$ -adrenérgicos (isoproterenol e IBMX) para realizar un western blot usando un anticuerpo que reconoce sustratos fosforilados por PKA (ver apéndice II de la sección Materiales y Métodos). En los western blot resultantes aparecían bandas, de las cuáles, la única que fuimos capaces de identificar con los anticuerpos de que disponíamos en el grupo (realizando un western en paralelo con las mismas muestras), fue perilipina. En la figura 50 aparece la fosforilación de la perilipina en los adipocitos *scramble* y *sicav1* después de haber sido incubados con los efectores  $\beta$ -adrenérgicos (isoproterenol 10 $\mu$ M e IBMX 5mM) y/o con insulina 100nM durante 30 minutos



**Figura 50. Fosforilación de la perilipina por PKA en adipocitos *scramble* y *sicav1*.** Los adipocitos *scramble* y *sicav1* fueron ayunados durante 2 horas, y posteriormente se estimularon con efectores  $\beta$ -adrenérgicos (isoproterenol 10 $\mu$ M e IBMX 5mM) y/o con insulina 100nM durante 30 minutos. Las células posteriormente se lisaron en un tampón que contenía 1% Tritón-X-100 e inhibidores de fosfatasa. La misma cantidad de cada extracto celular (50  $\mu$ g de proteínas) se usó para realizar western blot usando el anticuerpo anti-sustratos de PKA fosforilados o anti-perilipina.

## 6.2.2 Salida de ácidos grasos al medio extracelular

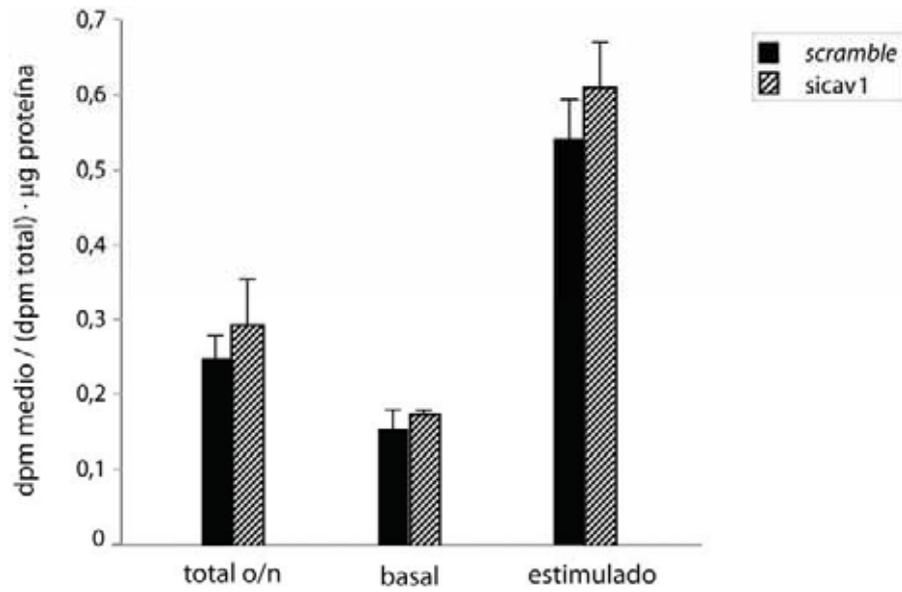
Como hemos visto en el apartado anterior, en presencia de efectores  $\beta$ -adrenérgicos, se activa la lipólisis mediante la vía dependiente de AMPc, mediada por PKA (ver apartado 3.4.3 de la sección Introducción). De esta manera se hidrolizan los triacilgliceroles almacenados en los LDs hasta liberar glicerol y ácidos grasos, que en principio son liberados al medio extracelular para que puedan ser captados por otros tejidos (músculo esquelético, corazón, corteza adrenal). Estos ácidos grasos pueden reesterificarse para volver a formar triacilgliceroles, o bien son liberados al medio extracelular.

Nos planteamos por tanto analizar la liberación de estos ácidos grasos procedentes de la movilización de los TAG de los LDs, al medio extracelular en los adipocitos *sicav1*.

Para ello, marcamos radiativamente el *pool* de TAG incubando los adipocitos durante 16 horas con [ $^{14}$ C]Oleato, posteriormente se eliminó este medio y se incubaron durante 30 minutos en medio sin (basal) o con efectores  $\beta$ -adrenérgicos (isoproterenol 10 $\mu$ M e IBMX 0,5mM). El medio se recogió y se midió la radiactividad (dpm; descomposiciones por minuto) respecto a la radiactividad total (dpm del medio + dpm de las células).

Como podemos ver en la figura 51, los adipocitos *scr* y *sicav1* acumulan los ácidos grasos de manera similar, ya que los medios recogidos después de una incubación larga con ácidos grasos marcados (total o/n) presentan la misma cantidad de radiactividad.

La deficiencia en caveolina-1 no afecta a la liberación de ácidos grasos de los adipocitos, ni en condición basal, ni estimulados por efectores  $\beta$ -adrenérgicos.



**Figura 51. Liberación de ácidos grasos al medio extracelular en adipocitos scr y sicav1.** Los adipocitos 3T3L1 *scramble* y *sicav1* sembrados en pozos de placas *6well* fueron incubados durante 16 horas con [<sup>14</sup>C]Oleato 50µM conjugado con BSA. Posteriormente se recogió este medio (total o/n), se lavaron las células y se incubaron sin (basal) o con efectores β-adrenérgicos durante 30 minutos. Tras lo cual se recogieron los medios y se cuantificó su radiactividad (en dpm). Para cada condición (total o/n, basal, β-adrenérgico), las células se lisaron y también se cuantificó la radiactividad que contenían. En la figura aparecen las dpm de cada uno de los medios recogidos, normalizadas respecto a la radiactividad total en cada pozo (dpm del medio+ dpm de las células).