

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

# **MATERIALES Y MÉTODOS**



# 1 Cultivos celulares

## 1.1 Normas generales de manipulación

Cuando se manipulan células en cultivo se deben seguir unas normas muy estrictas de limpieza. Se trabaja siempre dentro de una campana de flujo vertical que se limpia con etanol al 70% antes de comenzar a trabajar. El uso de llama dentro de ésta es opcional. Para evitar contaminaciones no se debe pasar las manos o cualquier objeto no estéril sobre el material estéril. Los medios de cultivo, las soluciones y todos los materiales que entran en contacto con las células han de esterilizarse, bien por filtración con filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro o por otros métodos (autoclave, irradiación, etc.). Estas condiciones se mantienen cuando las botellas se abren y cierran sólo dentro de la campana. Además, estas soluciones se atemperan a 37° C antes de ser utilizadas. Los restos biológicos se tratan con lejía al 30% y los materiales utilizados se autoclavan. Una vez finalizado el trabajo dentro de la campana se limpia la superficie con etanol al 70% y se reduce el flujo a las condiciones de mantenimiento. Generalmente, las células se mantienen en incubadores con las siguientes condiciones: 37° C, 90% de humedad relativa y 5% o 10% de CO<sub>2</sub>.

Los medios que se utilizan dependen de cada tipo celular. Estos medios se guardan a 4° C hasta la fecha de caducidad que indica la casa comercial y, una vez suplementados, se mantienen como máximo un mes a esta temperatura. La suplementación consiste en la adición de sustancias como L-glutamina, antibióticos o suero a partir de un stock que se mantiene a –20° C. La L-glutamina se añade como un suplemento ya que es un aminoácido inestable con una vida media de 15 días a 4° C. Los antibióticos utilizados rutinariamente son la penicilina y la estreptomina: la primera es un agente bacteriostático que sólo elimina bacterias en crecimiento (inhibe la síntesis de peptidoglicanos de la pared bacteriana), y la segunda es un aminoglucósido que inhibe específicamente la síntesis proteica del ribosoma bacteriano 70S. La geneticina es un antibiótico análogo a la neomicina que actúa sobre las células eucariotas inhibiendo la síntesis proteica y se utiliza para seleccionar líneas celulares transfectadas de manera estable. El suero que se ha utilizado es *Fetal Bovine Serum* (FBS) y *Calf Serum* (CS). Según la línea celular, el suero se somete a un tratamiento previo de inactivación (30 min. a 56° C) del sistema del complemento y de anticuerpos que pueden estar presentes. En algunos casos, si el medio sin suplementar no contiene HEPES, éste se puede añadir para mantener el pH cuando las células están fuera del incubador.

## 1.2 Líneas celulares

### 1.2.1 Línea celular 3T3L1

La línea celular usada para realizar la mayor parte del trabajo de esta tesis es la línea 3T3L1 de embrión de ratón adquirida a ATCC. L1 es una sublínea de 3T3 (*Swiss albino*) desarrollado mediante el aislamiento de un clon por Green y colaboradores (Green and Meuth, 1974). Esta línea se caracteriza por la diferenciación que sufren de preadipocitos a adipocitos cuando pasan de un estado proliferativo a uno de confluencia e inhibición por contacto.

Las células 3T3L1 se han manipulado siempre siguiendo las pautas estipuladas por ATCC. Como consideraciones principales, podemos destacar que las células se han cultivado siempre en superficie de plástico tratado para el cultivo celular, el medio de cultivo se ha cambiado 3 veces a la semana y se ha evitado que llegasen a confluencia durante su amplificación. Las células se han incubado a 37°C, 95% de humedad y 10% CO<sub>2</sub>.

### 1.2.2 Línea celular HeLa

Las células HeLa (ATCC CCL-2) (Dubbs and Scherer, 1969) son una línea de origen epitelial procedente de adenocarcinoma de cérvix humano. Presentan un fenotipo epitelial y tienen incorporadas secuencias del papilomavirus humano 18 (HPV-18). Estas células son ampliamente utilizadas para el estudio de proteínas expresadas de manera transitoria.

Estas células, como las Hek293, proliferan muy rápido por lo que deben subcultivarse al menos dos veces por semana. El número de pases afecta a la transfección transitoria. A partir del pase 20-25 el porcentaje de células transfectadas decae considerablemente.

El cultivo se hace en placas o flascos de cultivo, manteniendo las células en un incubador a 37°C, con un 95% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>.

### 1.2.3 Línea celular Hek293

La línea celular 293 deriva de células de epitelio renal humano (Hek; *human embryonic kidney*) transformado con el gen E1A de adenovirus (Graham et al., 1977). La línea 293T es un derivado de la 293 que además expresa el antígeno T largo del virus SV40, que permite la replicación episomal de los plásmidos que contengan un origen y región promotora temprana de SV40 (Alwine, 1985)

El cultivo se hace en placas o flascos de cultivo, manteniendo las células en un incubador a 37°C, con un 95% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>

## 1.3 Medios de cultivo

Reactivos:

Medio DMEM: Gibco 41966-029. Contiene 0,11 g/l de piruvato sódico, 2mM de glutamina y piridoxina, y 25mM (4,5 g/l) de glucosa (es un medio con alto contenido en glucosa)

Fetal Bovine Serum (FBS): Gibco 10270-106, inactivado a 56°C durante 20 minutos

Calf Serum (CS): BioWhittaker 14-401F, inactivado a 56°C durante 20 minutos

Penicilina/estreptomicina: (100X) Gibco 15140-122. 10.000 U/ml / 10.000 µg/ml

Albúmina (BSA): Sigma A-6003

Tripsina-EDTA: Gibco 25300-062. Tripsina 0,05% (w/v) EDTA 0,02% (w/v)

Geneticina: (G-418 sulfato, Gibco) 50mg/ml

HEPES 1,25M pH7,4

#### 1.3.1 Medio de cultivo de células HeLa y Hek293

- Medio DMEM (Gibco 41966-029):	500ml
- Penicilina/estreptomicina (100 U/ml/100 µg/ml)	5,7ml
- FBS (10%) previamente inactivado	55ml

#### 1.3.2 Medio de cultivo de fibroblastos 3T3L1 (10% CS)

- Medio DMEM (Gibco 41966-029):	500ml
- Penicilina/estreptomicina 100 U/ml/100 µg/ml (stock 100x)	5,7ml
- CS (10%) previamente inactivado	55ml
- HEPES 25mM (stock 1,25M)	11,4ml

#### 1.3.3 Medio de diferenciación 1

- Medio DMEM (Gibco 41966-029):	500ml
- Penicilina/estreptomicina 100 U/ml/100 µg/ml (stock 100x)	5,7ml

- FBS (10%) previamente inactivado	55ml
- Hepes 25mM (stock 1,25M)	11,4ml
- Insulina (Lilly) 5µg/ml (stock 5mg/ml, 1000X)	570 µl
- Dexametasona (Sigma D-2925) 0,25µM (stock1000X)	570 µl
- 1-metil-3-isobutilxantina(IBMx)(Sigma I-7018) 0,5mM Stock100mM (200x)	2,85 ml
(ver apéndice I)	

#### 1.3.4 Medio de diferenciación 2

- Medio DMEM (Gibco 41966-029):	500ml
- Penicilina/estreptomicina (100 U/ml/100 µg/ml)	5,7ml
- FBS (10%) previamente inactivado	55ml
- Hepes 25mM (stock 1,25M)	11,4ml
- Insulina (Lilly) 5µg/ml (stock 5mg/ml, 1000X)	570 µl

#### 1.3.5 Medio de diferenciación 3 o de adipocitos 3T3L1

- Medio DMEM (Gibco 41966-029):	500ml
- Penicilina/estreptomicina (100 U/ml/100 µg/ml)	5,7ml
- FBS (10%) previamente inactivado	55ml
- Hepes 25mM (stock 1,25M)	11,4ml

#### 1.3.6 Medio de ayuno

- Medio DMEM (Gibco 41966-029):	500ml
- Penicilina/estreptomicina (100 U/ml / 100 µg/ml)	5,7ml
- BSA (fatty acid free, sigma A6003)0,2%	1g
- Hepes 25mM (stock 1,25M)	11,4ml

#### 1.3.7 Medio de congelación de células

- FBS 90%
  - DMSO(dimetil sulfóxido)(Sigma D2650) 10%
- Este medio se prepara fresco y se enfría en hielo

### 1.4 Protocolo de división o subcultivo

La división o subcultivo consiste en la separación de células de la superficie donde están creciendo mediante la acción de una proteasa, la tripsina en nuestro caso, en ausencia de  $Ca^{2+}$  y de  $Mg^{2+}$ , y la posterior siembra en nuevas placas de cultivo a las concentraciones pertinentes en cada caso y el mantenimiento de un stock de células en condiciones de crecimiento óptimas.

#### Material y reactivos:

- Tripsina/EDTA (Gibco 25300-062)
- Medio de cultivo (para cada tipo celular)
- PBS

Procedimiento:

1. Eliminamos el medio de cultivo de las placas y las lavamos dos veces con PBS sin  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$ .

2. Añadimos la tripsina (la cantidad varía según la superficie de la placa, 1,5ml en un flascón de 75cm<sup>2</sup> o 1ml en una placa de 10cm de diámetro ( $\emptyset$ )(56cm<sup>2</sup>)). Dejamos que la proteasa actúe hasta observar que las células se redondean, se vuelven más refringentes y se despegan de la superficie. Entonces añadimos 5 veces el volumen que hemos usado de proteasa del medio de cultivo de las células (7,5ml si comenzamos con un flascón de 75cm<sup>2</sup>). Es importante que el tiempo de contacto de las células con la proteasa activa sea mínimo, ya que si no, podríamos afectar a proteínas de la superficie celular, y provocar un cambio en su fenotipo o un retardo en su crecimiento.

3- Recogemos todo el volumen del medio que contiene las células en un tubo que se centrifuga a 1300rpm (250 g) durante 3 minutos

4- Eliminamos el sobrenadante y resuspendemos el *pellet* en el volumen deseado de medio de cultivo (10-20ml). Una fracción de esta suspensión puede sembrarse a la dilución deseada según el momento y el número de células que necesitemos, o bien, en el caso de que necesitemos saber el número concreto de células que sembramos, como la siembra de los fibroblastos 3T3L1 para su posterior diferenciación a adipocito, tomamos 10 $\mu$ l de la suspensión de células y contamos el número de células en una cámara de Neubauer.

5- Finalmente sembramos el número de células que nos interesen en cada tipo de soporte. En el caso de preadipocitos 3T3L1 que posteriormente queremos diferenciar normalmente sembramos:

- 180.000 células por placa de 10 cm  $\emptyset$  (56cm<sup>2</sup> de superficie)
- 150.000 células por placa de 6 pozos (placas *6well*) (9,5 cm<sup>2</sup> por pozo)
- 480.000 células por placa de 15cm  $\emptyset$  (145cm<sup>2</sup> de superficie)

Usando estas cantidades de células, el protocolo de diferenciación comienza 9 días después haber realizado la siembra.

## 1.5 Protocolo de congelación de células

Este protocolo se ha de llevar a cabo con células casi confluentes pero todavía en fase de crecimiento exponencial y usando unos pases no muy elevados.

Material y reactivos:

- Tripsina/EDTA (Gibco 25300-062)
- Medio de cultivo (para cada tipo celular)
- PBS
- Medio de congelación (1.3.7)

Procedimiento:

1. Despegamos las células de la superficie donde están creciendo mediante tripsinización (siguiendo los pasos 1, 2 y 3 del apartado anterior, 1.4).

2. Eliminamos el sobrenadante y resuspendemos las células a una densidad de 0,5-1 x 10<sup>6</sup> células/ml en medio de congelación frío (4°C). Hacemos alícuotas de 1ml en criotubos de estériles.

3. Los criotubos se colocan en un recipiente que contiene isopropanol en sus paredes (nosotros hemos usado los recipientes “*Stratacooler Cryo Preservation Modules*”) y se congelan a -80°C. Después de 24 horas, transferimos los criotubos a un tanque de nitrógeno líquido.

Los cultivos celulares se pueden mantener durante años congelados en nitrógeno líquido. Es conveniente mantener stocks congelados de células de las primeras subdivisiones,

ya que los cultivos tienden a envejecer y a modificar sus características en los subcultivos sucesivos. Además, es muy importante mantener siempre los stocks de líneas celulares que utilizamos para poder continuar los cultivos en caso de contaminación.

## 1.6 Protocolo de descongelación

Este proceso debe llevarse a cabo de manera muy rápida.

1. Sacamos el criotubo del tanque de nitrógeno líquido y se descongela rápidamente en un baño a 37°C.

2. Una vez descongelado el criotubo, la suspensión que contiene se resuspende en 5ml de medio de cultivo calentado a 37°C. y se plaquea en un flascón de 25cm<sup>2</sup> que dejamos en el incubador a las condiciones requeridas por el tipo celular (37°C, 95% de humedad y 5 o 10% de CO<sub>2</sub>)

3. Tras 12 horas, cambiamos el medio del cultivo para eliminar los restos de células muertas y de DMSO, por medio fresco.

Alternativamente, en el paso 2, la suspensión celular puede centrifugarse a 1300rpm (250g) durante 3 minutos, eliminar el sobrenadante y resuspender las células con 10ml de medio fresco que entonces plaqueamos en un flascón de 25cm<sup>2</sup> (eliminamos así el DMSO inmediatamente) y lo dejamos en el incubador de células. Proseguimos con el paso 3 al día siguiente.

## 1.7 Detección de micoplasma

La mayor parte de las contaminaciones de los cultivos (bacterias, hongos, levaduras...) son fácilmente detectables a simple vista, ya que el medio a menudo se vuelve turbio, acidifican el medio al fermentar los nutrientes, y desprenden un olor característica, y a menudo se observan mediante un microscopio invertido. Sin embargo, la contaminación por micoplasma suele pasar desapercibida al tratarse de un parásito intracelular que suele provocar un aumento del tiempo de replicación de la línea. Es aconsejable realizar periódicamente un test que sea capaz de detectar diferentes especies del parásito. En este trabajo se ha utilizado el *EZ-PCR Mycoplasma Test Kit (Biological, Industries Co.)* basado en la amplificación por PCR del genoma del parásito. Contiene oligonucleótidos degenerados capaces de amplificar una secuencia en las ocho especies más comunes de micoplasma. Como molde de la reacción se utiliza 1 ml de medio de cultivo que ha estado al menos 48 h en contacto con las células.

## 1.8 Diferenciación de las células 3T3L1

1. Los fibroblastos/preadipocitos 3T3L1 se mantienen en cultivo en medio con 10%CS (1.3.2) hasta que llegan a confluencia, aproximadamente 9 días después de haberlos sembrado a una densidad de 180.000 células por placa de 10cm Ø (ver apartado 1.4).

2. Dos días después de llegar a confluencia, al que llamamos día 0 (d0), comienza el protocolo de diferenciación sustituyendo el medio de cultivo de los fibroblastos por el medio de diferenciación 1 (1.3.3)

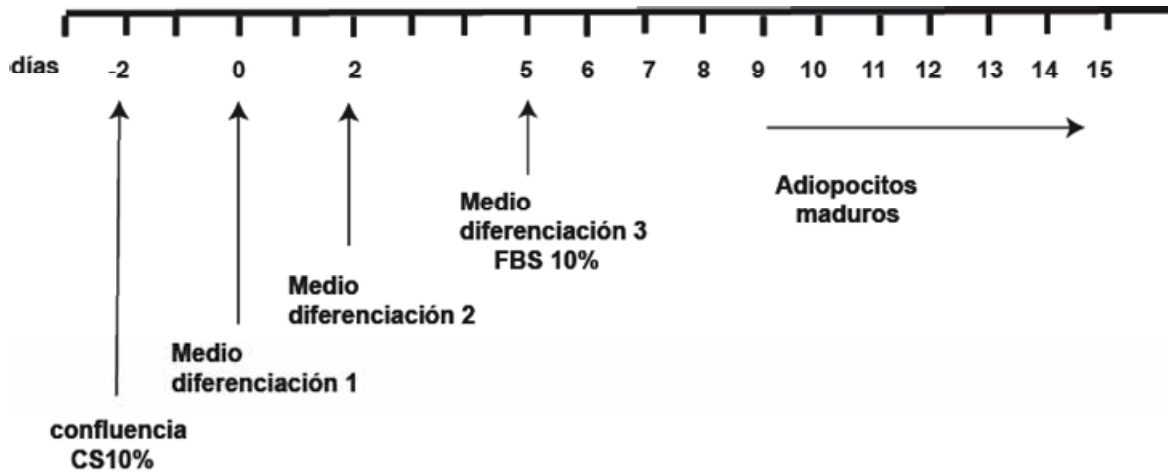
3. Dos días más tarde, día 2 (d2), cambiamos el medio por el medio de diferenciación 2 (1.3.4).

4. Pasado tres días, día 5 (d5) sustituimos el medio de diferenciación 2 por el medio de diferenciación 3 (1.3.5). A partir de este momento las células se mantendrán en este medio (FBS 10%) cambiando el medio cada dos días.

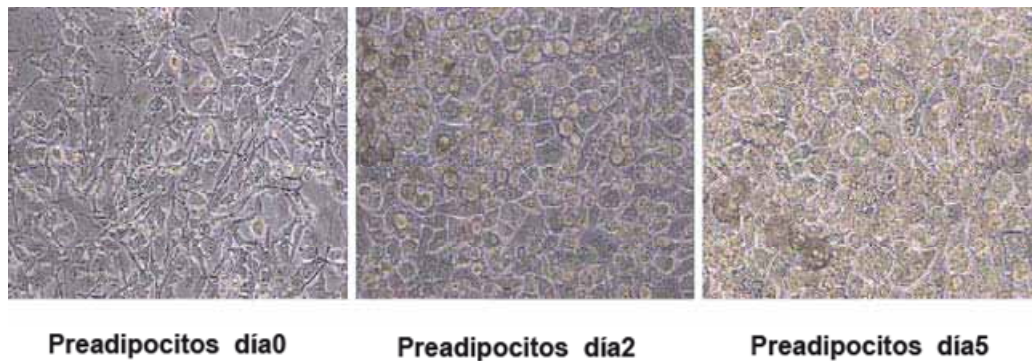


5. Las células se consideran totalmente diferenciadas y con fenotipo de adipocito maduro a partir del día 9-10. Estas células diferenciadas se pueden usar durante las dos semanas siguientes (figura 1).

**A**



**B**



**Figura 1. Protocolo diferenciación de los preadipocitos 3T3L1.** A. Esquema del protocolo de diferenciación. B. Imágenes en campo claro de preadipocitos 3T3L1 en diferentes días del protocolo de diferenciación tomadas con un microscopio invertido.

## 1.9 Transfección transitoria de líneas celulares

### 1.9.1 Método de precipitación con fosfato cálcico

Este método se basa en la introducción de un coprecipitado de fosfato cálcico y DNA exógeno en la célula. {Sambrook J., 1989 491 /id;Wigler, 1979 610 /id}. El mecanismo por el cual el precipitado entra en la célula no está muy claro, aunque se cree que inicialmente se adhiere a la superficie de la célula y por endocitosis se incorpora al interior de ésta. Este precipitado se forma al mezclar dos soluciones, una salina que contiene cloruro cálcico y otra

de tamponación que contiene el fosfato; el DNA presente queda incorporado en los cristales del precipitado formado.

Uno de los parámetros más importantes en este método es el pH de la solución que contiene el fosfato. Pequeñas variaciones en este factor determinan el tamaño del precipitado y por consiguiente su endocitosis en la célula. Se recomienda probar la eficiencia de transfección con soluciones de fosfato de diferente pH dentro de un rango óptimo teórico de 6-7. Este rango puede variar considerablemente entre las diferentes líneas celulares y la calidad del DNA que se utiliza.

Para monitorizar la eficiencia de transfección, se utiliza habitualmente un plásmido que codifica la *Green Fluorescent Protein* (GFP). Las células se transfectan con el plásmido de interés y un 10% de plásmido GFP. En el caso de que la construcción que introducimos exprese ya esta proteína GFP (como es el caso de las construcciones pLVTH-siRNA, apartado 2.3), no hace falta añadir este plásmido que codifica GFP. De esta manera, se puede conocer el porcentaje de células transfectadas cuando se cuentan en un citómetro de flujo. Un parámetro que puede ser importante en la formación del precipitado es la cantidad de DNA. En este trabajo se ha utilizado siempre la misma cantidad en función del número de células a transfectar: 20  $\mu\text{g}$  de DNA en una placa de 10cm  $\emptyset$ ; 40  $\mu\text{g}$  de DNA en una placa de 15cm  $\emptyset$ , y 4  $\mu\text{g}$  en un pocillo de una placa *6well*. Finalmente, se debe tener en cuenta la densidad del cultivo celular en el momento de la transfección. Este parámetro depende del tipo celular y del tipo de experimentos que vayamos a hacer con las células, por ejemplo, las transfecciones con fosfato cálcico de células HeLa se realizan sobre cultivos que se encuentran entre un 20% y un 50% de confluencia.

#### Material y reactivos:

- Solución de Calcio:
  - $\text{CaCl}_2$  500 mM
  - BES 100 mM (Fluka).

El pH se ajusta a 6.95, se filtra y se conserva a temperatura ambiente. Si se prepara más de 50 ml se hacen alícuotas que se mantienen a  $-20^\circ\text{C}$ .

- Solución de Fosfato:
  - NaCl 50 mM
  - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.75 mM
  - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.75 mM
  - BES 50 mM

Se hacen alícuotas que oscilan entre sí 0.02 puntos de pH con NaOH. Se filtran y se guardan a temperatura ambiente.

- Agua inyectable de Braun (Aqua B. Braun, B. Braun Medical SA) o agua Milli Q estéril.
- Preparaciones de DNA de interés. Se recomienda el uso de preparaciones concentradas a 1mg/ml o más obtenidas a partir de un cultivo bacteriano de 500 ml por MaxiPrep (Qiagen).
- PBS estéril.

#### Procedimiento:

Todo el proceso de transfección se lleva a cabo en una campana de flujo laminar ya que implica la manipulación de células en cultivo.

1. Las células se siembran el día antes o el mismo día por la mañana teniendo en cuenta que deben alcanzar el 20-40 % de confluencia en el momento de la transfección. El medio de cultivo se reemplaza por medio fresco sin Hepes antes de la transfección.

2. La mezcla de DNA se prepara en un tubo estéril de 15 ml: 18  $\mu\text{g}$  del DNA de interés, 2  $\mu\text{g}$  de plásmido GFP y hasta 250  $\mu\text{l}$  de agua. Si se trata de una transfección doble o triple, se mezclan cantidades equimolares de DNA. (Las cantidades de DNA y soluciones están indicadas para transfectar células crecidas en una placa de 100mm de  $\varnothing$ ).

3. Se añade 250  $\mu\text{l}$  de la solución de Calcio y se agita vigorosamente para mezclar el Calcio y el DNA.

4. Se introduce una pipeta de 2 ml y con el pipeteador automático se hacen burbujas mientras se añaden 500  $\mu\text{l}$  de la solución de Fosfato gota a gota.

5. Se deja reposar 15 min. a temperatura ambiente para favorecer la formación de los precipitados. Es importante que la temperatura de la campana no sea elevada.

6. Transcurrido este tiempo, se vuelve a hacer burbujas con el pipeteador automático durante 15-20 s y se añade a las células gota a gota mientras se agita la placa para distribuir la solución de transfección.

7. Pasadas 12-20 h. se sacan las células del incubador, se lavan dos veces con PBS y se añade medio de cultivo fresco. Alternativamente, las células se pueden tripsinizar y volver a sembrar según el experimento que se quiera realizar. Es conveniente que el 10% se siembre en un pocillo de una placa de 12 y se destine para calcular el porcentaje de transfección en el citómetro de flujo. Al cabo de 24-48 h se puede realizar el experimento y la monitorización de la transfección en el citómetro de flujo.

### 1.9.2 Método de transfección usando PEI

El compuesto PEI (polietilimina) es un polímero catiónico capaz de unirse al DNA y formar complejos que se agregan y pueden introducirse en la célula. (Godbey et al., 1999; Wightman et al., 2001).

#### Material y reactivos:

- NaCl 150 mM estéril (usando filtros de 0,22  $\mu\text{m}$ )
- Solución PEI 1mg/ml pH7. (Polysciences Inc. ref. 23966). Se prepara disolviendo en agua el reactivo PEI. (es un proceso lento que requiere el calentamiento de la solución para que ocurra). Se debe ajustar el pH de la solución a 7, con mucho cuidado ya que la solución no está tamponada. Se preparan alícuotas de 1ml y se guardan a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Preparaciones de DNA de interés. Se recomienda el uso de preparaciones concentradas a 1mg/ml o más, obtenidas a partir de un cultivo bacteriano de 500 ml por MaxiPrep (Qiagen). Para transfectar una placa de 10 cm  $\varnothing$  usaremos 20  $\mu\text{g}$  de DNA total, 4 $\mu\text{g}$  por pozo de placa *6well* o 40 $\mu\text{g}$  de DNA total por placa de 15cm  $\varnothing$ .

#### Procedimiento:

1. Las células se siembran el día antes o el mismo día por la mañana a la confluencia necesaria para el protocolo para el que necesitemos la transfección, para la producción de lentivirus por ejemplo, se usan placas confluentes de células HeK293, en cambio, para la mayoría de experimentos que requieren la expresión transitoria de una proteína se suele usar una confluencia del 20-40% de las células en el momento de la transfección. El medio de cultivo se reemplaza por medio fresco antes de la transfección

2. La mezcla de DNA se prepara en un tubo estéril de 1,5 ml (*ependorf* de 1,5ml). En el caso de una placa de 10cm  $\varnothing$ , mezclaremos 20 $\mu\text{g}$  de DNA con NaCl 150mM hasta un volumen final de 1560  $\mu\text{l}$  (250  $\mu\text{l}$  por pozo de placa *6well*, 3900  $\mu\text{l}$  por placa 15 cm  $\varnothing$ ).

3. Añadimos la solución de PEI (78  $\mu\text{l}$  por placa de 10cm  $\varnothing$ , 12  $\mu\text{l}$  por pozo de placa *6well*, 180  $\mu\text{l}$  por placa de 15cm  $\varnothing$ ). Agitamos fuertemente con ayuda del vórtex durante 15-20".

4. Se deja reposar 15-20 minutos a temperatura ambiente y añadimos la mezcla lentamente a las placas.

5. Pasadas 12-20 horas se procede como en el apartado 1.9.1.

### 1.9.3 Electroporación de adipocitos 3T3L1

#### Material y reactivos:

- Colágeno IV de ratón ( BD Biosciences : 354233 )

Se encuentra a una concentración stock: 500 µg/ml en HCl 50 mM estéril. Se descongela a 4°C y hacemos alícuotas de 100µl que guardamos a -80°C. El colágeno IV se usa en un rango de concentraciones de 1 a 10 µg/cm<sup>2</sup> de superficie de placa de cultivo. Nosotros usamos una concentración final de 5 µg/cm<sup>2</sup>. En pozos de 10 cm<sup>2</sup> (pozos de placa *6well*) se deben poner 50 µg de colágeno IV (100 µl del stock en 900 µl de HCl 50 mM)

- PBS sin Mg<sup>2+</sup> ni Ca<sup>2+</sup>: D-PBS Gibco BRL 14190-029

- PBS estéril de cultivos

- Tripsina-EDTA

- 1 placa de 15cmØ (= 3 placas de 10 cmØ) de adipocitos tras 4-5 días de haber añadido el medio de diferenciación 1 (d4-d5) para dos cubetas de electroporación (1 ml PBS: 500 µl/cubeta). Una cubeta para 2 pozos de 6 *well*

- 50 µg DNA (como mucho 150 µg)/ cubeta (si queremos electroporar dos construcciones se puede llegar a 200 µg)).

- Si la siembra de adipocitos electroporados será en placa de 10 cmØ: usaremos una placa de 15cmØ para una cubeta de electroporación con 100-150 µg de DNA-

- Plásmidos de interés resuspendidos en agua bidestilada.

#### Procedimiento:

1. Preparamos la solución de colágeno IV 50µg/ml en HCl 50mM estéril, y repartimos 1ml de esta solución en cada pozo de una placa *6well* o lo añadimos a una placa de 10 cmØ.

2. Incubamos la placa una hora a temperatura ambiente con agitación.

3. Aspiramos la solución de colágeno y lavamos la placa dos veces con PBS. Guardamos la placa en la campana de cultivos hasta el momento de sembrar las células electroporadas.

4. Partimos de adipocitos 3T3L1 tras 6-7 días de haber añadido el medio de diferenciación 1 (d4-d5), crecidos en una placa de 15cmØ. Lavamos bien las placas con PBS.

- Los adipocitos obtenidos de una placa de 15cmØ (= 2,5 placas de 10 cmØ) los usaremos para dos electroporaciones independientes, y las células de cada cubeta se siembran repartidas en dos pozos de placa *6well*.

- Alternativamente, los adipocitos de una placa de 15cm Ø los usaremos para una sola electroporación y los sembraremos en una placa de 10cm Ø.

5. Añadimos 3ml de tripsina-EDTA. Mezclamos bien, aspiramos la tripsina e incubamos la placa 10 minutos a 37°C.

6. Una vez que las células comienzan a desengancharse añadimos 3ml de medio completo 10%FBS y resuspendemos las células con ayuda de una pipeta.

7. Transferimos las células a un tubo de 50ml y las centrifugamos 5 minutos s 680 rpm (110g) a temperatura ambiente.

8. Descartamos el sobrenadante y resuspendemos el *pellet* de células, en 40 ml de D-PBS. Repetimos el paso 7 8 y finalmente resuspendemos el *pellet* en el volumen adecuado de D-PBS para la electroporación: 1ml si vamos a sembrar pozos de placas *6well*, o 500 µl si

vamos a sembrar una placa de 10cm Ø. Aproximadamente necesitamos 10 millones de células en 500 µl de D-PBS.

9. Colocamos el DNA en el fondo de una cubeta de electroporación. La cantidad de DNA necesaria puede oscilar entre 50-150µg por cubeta (como mucho 200µg si quiero electroporar dos construcciones). Es aconsejable electroporar diferentes cantidades y así poder comparar eficiencias.

10. Añadimos 500µl de la suspensión de células a cada cubeta de electroporación y mezclamos por inversión 10-15 veces.

11. Inmediatamente colocamos la cubeta en el electroporador y sometemos a la mezcla de células y DNA a una capacitancia de 960 mF y un voltaje de 0,16 kV. Es importante que el valor de la constante de tiempo oscile entre 20-30 mseg. En este paso se ha de trabajar con rapidez para evitar la degradación del DNA.

12. Añadimos 1ml de medio completo 10%FBS a cada cubeta. Con una pipeta P1000 descartamos las células muertas que flotan en la superficie y transferimos la suspensión de células electroporadas a un tubo estéril que contiene 4ml de medio completo. Lo dejamos reposar 10 minutos.

13. Transcurrido este tiempo pasamos la suspensión celular (4ml) a dos pozos de placas *6well* (previamente tratados con colágeno IV) o a una placa de 10cm Ø.

14. Después de 12 horas de la electroporación cambiamos el medio de las placas con mucho cuidado de no desengancharlas.

15. A las 30 horas de la electroporación podemos comenzar los experimentos con las células.

#### **1.9.4 Transfección de siRNA usando Lipofectamina 2000 de Invitrogen**

Para la introducción de moléculas de RNA de doble cadena (siRNA) usamos el reactivo de Invitrogen “Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent” que es un reactivo catiónico que forma liposomas y cuya eficiencia en la introducción de este tipo de material genético en la mayoría de tipos celulares, es muy alta ([www.invitrogen.com/celllines](http://www.invitrogen.com/celllines)).

##### Materiales y reactivos:

- “Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent” de Invitrogen
- Medio Opti™-MEM de Invitrogen sin antibióticos
- Suspensión de siRNA (o DNA)
- Medio de cultivo

##### Procedimiento:

1. Sembrar las células para que en el momento de la transfección estén entre el 30-50% de confluencia.
2. En el momento de la transfección cambiar el medio por 2ml/pozo de placa *6well* de medio sin antibiótico Opti™-MEM
3. Diluir 375 pmoles de cada siRNA con 750µl de OptiMEM
4. En otro tubo mezclar 7,5µl de Lipofectamine con 750 µl de OptiMEM. Esperar 5 minutos.
5. Mezclar el contenido de ambos tubos, agitar y esperar 20 minutos (no más de 30 minutos).
6. Añadir 500 µl de la mezcla a cada pozo de placa *6well* (3 pozos). La concentración final del siRNA en cada pozo es 50nM.
7. Homogeneizar la suspensión moviendo la placa en cruz
8. A las 6-8 horas cambiar el medio por el medio habitual de las células
9. Esperar 48-72 horas antes de realizar los experimentos.

## 1.10 Obtención de líneas HeLa estables

La generación de líneas celulares estables consiste en la integración de un vector previamente transfectado en la célula que tiene dos cajas de expresión de tal forma que permite la expresión tanto del transgen de interés como la de otra proteína que confiere resistencia a un antibiótico y permite seleccionar las células que posean el plásmido integrado en su genoma. En este trabajo, hemos generado líneas estables de células HeLa que expresaban permanentemente la proteína caveolina-1 murina clonada en el vector pCDNA3 que contiene la caja de expresión que confiere resistencia a la Geneticina (antibiótico que impide la traducción en células eucariotas). Datos previos de nuestro laboratorio (tesis doctoral de Meritxell Orpinell, Esperanza Fernández) muestran que la concentración mínima de geneticina activa que provoca la muerte de las células HeLa sin transfectar es de 400µg/ml tras 36-48 horas de ser añadida al medio

### Materiales y reactivos:

- Material de cultivo celular
- Geneticina G-418 sulfato (Gibco) (50mg/ml)

### Procedimiento:

1. Las células se transfectan en una placa de 10cm Ø, mediante el método de fosfato cálcico o usando PEI, tal y como se indica en el apartado 1.9.1.
2. Tras 48 horas, procedemos a tripsinizar y contar las células para sembrarlas a distintas densidades en placas de 15cm Ø. Es importante no sembrar un elevado número de células que potencialmente hayan introducido el vector ya que la intención de este protocolo es aislar clones independientes. Los rangos de concentración celular usados fueron  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  células/placa de 15cm Ø, aunque estas cantidades dependen de la eficiencia de la transfección. Generamos esta batería de diluciones por triplicado (tres placas por dilución), tanto para la construcción de interés como para el plásmido pCDNA3 vacío. También sembraremos células sin transfectar para comprobar la eficiencia del antibiótico provocando la muerte celular.
3. Tras 24 horas (72 horas después de la transfección) añadimos geneticina 400µg/ml al medio con la intención de iniciar la selección de las células que se han transfectado y han integrado en su genoma el plásmido. A partir de ahora, cambiaremos el medio cada 3-4 días añadiendo siempre el antibiótico al medio. Las células que hayan incorporado el plásmido sobrevivirán y formarán colonias en las placas.
4. Después de una semana (a veces dos) ya es posible distinguir colonias de células procedentes de un sola célula (clones) independientes, es importante seleccionar aquellos clones que estén suficientemente separados del resto de tal forma que se puedan recoger evitando contaminaciones entre clones (normalmente 8-10 clones por placa de 15cm Ø se encuentran bien separados).
5. Para recoger los clones, se lava la placa con PBS dos veces, se tripsinizan individualmente con 25µl de tripsina y se recogen con una micropipeta para llevar la suspensión celular a un pozo de una placa 24well que contiene 1ml de medio con antibiótico.
6. Seguimos el crecimiento de cada uno de los clones aislados (es recomendable aislar entre 40-50 clones para asegurarnos la obtención de líneas que expresen la proteína exógena), sembrándolas sucesivamente, en pozos de placas 6well y en placas de 10cm Ø. Siempre cambiando el medio con antibiótico cada 3-4 días.
7. Una vez obtenemos el número deseado de células procedemos a su congelación (apartado 1.5) y a realizar los ensayos necesarios para verificar la expresión de la proteína deseada, en nuestro caso valoramos la cantidad de caveolina-1 expresada mediante SDS-PAGE y western-blot, y su localización mediante técnicas de inmunofluorescencia.

### 1.11 Contaje del número de células mediante el marcaje con yoduro de propidio

Para seguir el crecimiento de una línea celular y poder compararlo con el de otra línea, es necesario contar de manera precisa el número de células. Para ello siguiendo el protocolo recomendado por el “Servicio de Citometría de Flujo” de los “Servicios Científico-técnicos” de la Universidad de Barcelona.

1. Fijación de las células con etanol:
  - Recoger las células a contar en un tubo con 5ml de PBS
  - Centrifugar las células 5 minutos a 200g
  - Resuspender las células en 500 $\mu$ l de PBS. Es importante que las células no formen agregados en este paso, ya que quedarían estabilizados durante la fijación
  - Mezclar las células con 4,5 ml de etanol 70%. Mantener la mezcla al menos dos horas (o guardarlas entre 0—40°C)
2. Marcaje con yoduro de propidio:
  - Centrifugar las células en etanol 5 minutos a 200g. Eliminar el sobrenadante
  - Resuspender las células en 5ml de PBS, esperar 1 minuto y volver a centrifugar.
  - Resuspender el pellet en 1ml de solución IP/Tritón RNasa 15 minutos a 37°C o bien 30 minutos a temperatura ambiente.

Solución IP/Tritón/RNasa: A 10ml de PBS-0,1% Tritón, se añaden 2mg de RNasa A (sin DNasa) y 200 $\mu$ l de yoduro de propidio 1mg/ml (Molecular Probes).

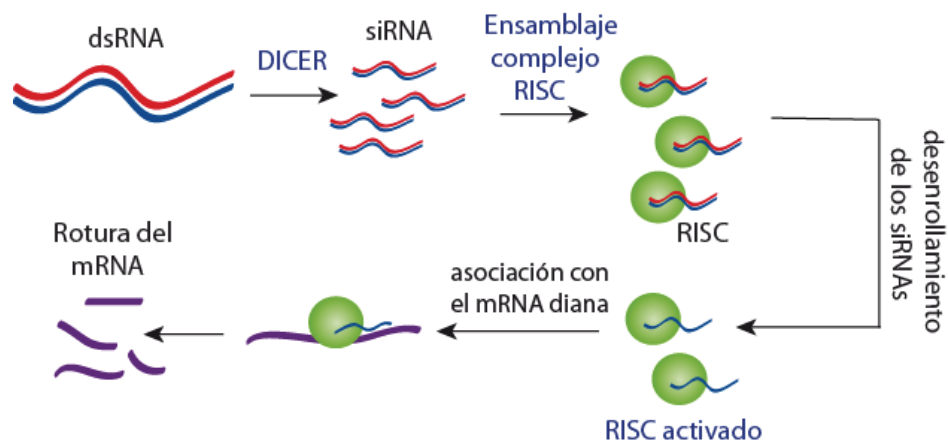
3. Análisis del número de células mediante citometría de flujo (Contador de partículas Multisizer II.) que detecta el número de núcleos marcados por el yoduro de propidio (es un intercalante de DNA).

## 2 Silenciamiento génico posttranscripcional mediante *RNA interference*

La técnica de *RNA interference* (iRNA) es una forma de silenciamiento génico posttranscripcional en la que una molécula de RNA de doble cadena provoca la degradación del RNA transcrito homólogo endógeno, imitando así el efecto de reducción o pérdida de actividad génica. En células de mamífero, para que ocurra este silenciamiento específico, las secuencias de RNA de doble cadena que introducimos en las células diana han de tener una longitud concreta, entre 19 y 21 nucleótidos, son los llamados *small interference RNA* (siRNA).

### 2.1 Diseño de los siRNA

Como hemos mencionado, los siRNAs son moléculas de RNA de doble cadena con una longitud de 19-23 nucleótidos que se caracterizan por tener en los extremos 3' dos nucleótidos sobresalientes (no apareados). El proceso de interferencia es un proceso de regulación posttranscripcional altamente coordinado en el cual se produce la degradación específica de mRNA. El complejo enzimático encargado de generar estas moléculas específicas a partir de pequeñas moléculas de RNA de doble cadena se denomina DICER y pertenece a la familia de nucleasas específicas de RNA de doble cadena. Los siRNA son reconocidos por el complejo enzimático RISC (*iRNA silencing complex*) que cataliza el desenrollamiento de la molécula de RNA dúplex, la unión e interacción específica con el mRNA endógeno y la rotura específica del mismo. El mRNA resultante es reconocido en la célula como aberrante y es destruido por otras ribonucleasas.



**Figura 2.** Esquema del proceso enzimático de degradación del mRNA diana mediante *RNA interference*.

La transfección de estos siRNAs o de un vector capaz de expresarlos en una célula permite la inhibición total o parcial de la expresión del gen diana. El grado de inhibición depende de distintos parámetros biofísicos y termodinámicos relacionados con el mecanismo catalítico del que resulta la degradación del MRNA. Así, se han de tener en cuenta una serie de criterios empíricos para obtener un siRNA funcional, como los expuestos en el apartado 2.1 de los Resultados. Para la selección de los siRNA que afectaran específicamente el RNA mensajero de la caveolina-1 murina (NM\_007616), usamos el programa informático de Ambion: [http://ambion.com/techlib/misc/siRNA\\_design.html](http://ambion.com/techlib/misc/siRNA_design.html) para diseñar los 5 primeros siRNA (1-5)(ver apartado 2.1 de los resultados). Posteriormente, seleccionamos otros 4 siRNA (3P,6,7,8) contra el MRNA de la caveolina-1, atendiendo a más criterios de accesibilidad del RNA y termodinámicos, usando el programa que facilita de manera gratuita la dirección <http://ozone2.chem.wayne.edu> y el programa “sfold” basado en el anterior también accesible mediante la dirección <http://sfold.wadsworth.org>

## 2.2 Obtención de las moléculas de siRNA *in vitro*.

Para la obtención de las moléculas de RNA de doble cadena, usamos el kit de Ambion “Silencer™ siRNA construction kit”(catalog nº #1620), mediante el cual se sintetizan *in vitro* las moléculas de siRNA a partir de los oligonucleótidos de DNA diseñados en el apartado anterior, usando la polimerasa T7 de RNA. Para ello, a las secuencias seleccionadas contendrán además en el extremo 3’ la secuencia de 8 nucleótidos 5’-CCTGTCTC-3’ que es complementaria al primer promotor de la polimerasa T7. El procedimiento brevemente consiste en:

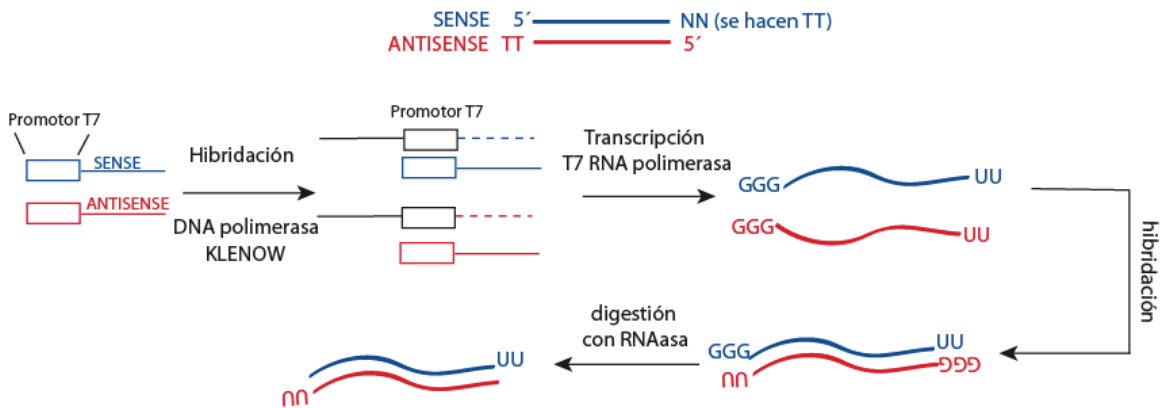
1. Las dos secuencias de 29 oligonucleótidos (21+8) de DNA son hibridadas por separado con la del primer del promotor T7 proveída por el kit.
2. Los extremos 3’ de los oligonucleótidos son alargados mediante la DNA polimerasa Klenow, creando así las cadenas los moldes de DNA (*sense* y *antisense* por separado) de cada una de las cadenas de los siRNA.



3. Estos moldes de siRNA *sense* y *antisense* son transcritos por la T7 RNA polimerasa y los RNA resultantes se hibridan para generar los RNA de doble cadena (RNAds)

4. Las secuencias *leader* generadas por la T7 RNA polimerasa son eliminadas digiriendo los RNAds con una ribonucleasa de RNA de cadena simple (que no elimina residuos uracilo, U)

5. Los siRNA resultantes son purificados mediante su unión a un filtro de fibra de vidrio y su posterior elusión.



**Figura 3.** Esquema de la obtención de moléculas de siRNA *in vitro*. Adaptado de [www.ambion.com](http://www.ambion.com)

### 2.2.1 Hibridación de cada oligonucleótido molde con el primer promotor de T7

Para cada siRNA (1-5), en tubos separados se mezclaron:

- 2  $\mu$ l primer del promotor T7 (proveído por el kit)
- 6  $\mu$ l tampón de hibridación de DNA (kit)
- 2  $\mu$ l de los oligonucleótidos sense o antisense a una concentración 100 $\mu$ M

Se calentó la mezcla a 70°C durante 5 minutos, luego se dejó a temperatura ambiente otros 5 minutos.

### 2.2.2 Reacción de la DNA polimerasa Klenow

A los nucleótidos hibridados le añadimos

- 2  $\mu$ l tampón de reacción Klenow 10X
- 2  $\mu$ l mezcla de dNTP 10X
- 4  $\mu$ l agua sin nucleasa
- 2  $\mu$ l polimerasa exo-Klenow

La mezcla se homogeneizó e incubó a 37°C durante 30 minutos

### 2.2.3 Síntesis de los RNA de doble cadena

Para cada reacción de transcripción se mezclaron

- 2  $\mu$ l moldes sense o antisense obtenidos en el apartado anterior
- 4  $\mu$ l agua sin nucleasas
- 10  $\mu$ l mezcla de dNTP 2X
- 2  $\mu$ l tampón de reacción de T7

- 2  $\mu$ l enzima T7 polimerasa

Incubamos la mezcla 2 horas a 37°C. Combinamos las dos reacciones, sense y antisense, en un tubo y las dejamos incubando toda la noche (o/n) a 37°C.

#### 2.2.4 Digestión de los siRNA con RNasa y DNasa

Mezclamos

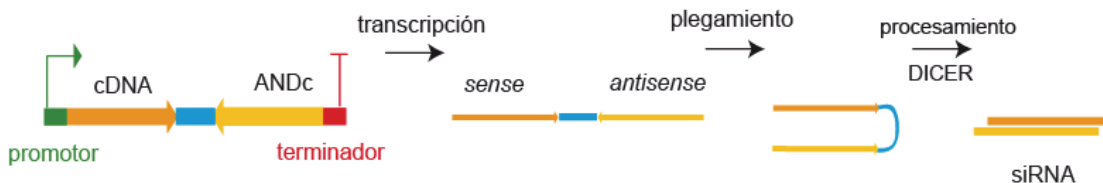
- 6  $\mu$ l tampón de digestión
- 48,5  $\mu$ l agua
- 3  $\mu$ l RNasa
- 2,5  $\mu$ l DNasa

Incubamos la mezcla 2 horas a 37°C

Antes de usar los siRNA, se purificaron mediante la unión a las columnas de filtro de fibra de vidrio proveídas por el kit de Ambion y su posterior elución tal como indica el protocolo de este kit.

### 2.3 Obtención de vectores lentivíricos que expresan siRNA en la célula

La expresión de siRNA en las células se puede conseguir mediante vectores que contengan/expresen las secuencias *sense* y *antisense* de los siRNA separadas por una pequeña secuencia (*loop*) de tal manera que, cuando se transcribe toda esta secuencia de nucleótidos (*sense-loop-antisense*) en la célula, el transcrito obtenido puede hibridar consigo mismo y formar una estructura de RNA de doble cadena, esta molécula es susceptible de ser procesada por el complejo enzimático DICER que genera así las moléculas de siRNA.



El vehículo de entrada de los siRNA que se escogió en esta tesis es el sistema lentiviral. Con esta finalidad se usó el vector pLVTHM (facilitado por el laboratorio del Dr. Trono de la "Université de Genève" ([www.tronolab.com](http://www.tronolab.com))). Brevemente este vector contiene el promotor H1 que permite la expresión del siRNA, además contiene el promotor del factor de elongación 1 alfa que dirige la expresión de GFP (que permite valorar la eficiencia de la infección así como separar las células infectadas de las que no lo están).

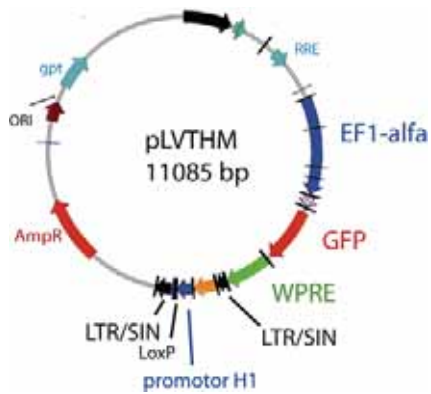


Figura 4. Mapa del vector pLVTHM donde se muestran los principales elementos del vector. Adaptado de [www.tronolab.com](http://www.tronolab.com)

Para el diseño de los siRNA procedimos como se describe en el apartado 2.1 de la sección resultados, y obtuvimos las secuencias de los siRNA 1-5 y 3P, 6, 7 y 8 que se muestran el apartado 2.1 de los resultados. En este caso, para conseguir los dúplex de DNA que se puedan clonar en el vector pLVTHM mediante las dianas Mlu I y Cla I, a cada una de las secuencias de 19 nucleótidos le añadimos los nucleótidos necesarios para la clonación (dianas) y los nucleótidos que permiten la formación de un bucle (*loop*) y una señal de STOP para la RNA polimerasa III.

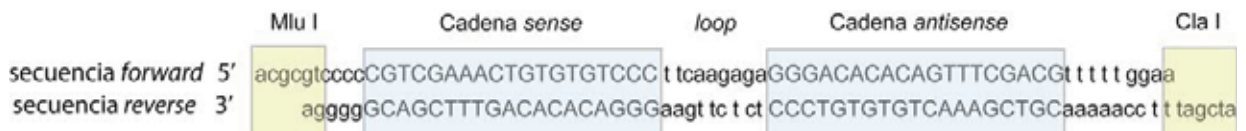


Figura 5. Esquema de los oligonucleótidos diseñados para expresar los siRNA. La secuencia mostrada corresponde al siRNA3.

Los oligonucleótidos diseñados se pidieron a una casa comercial, y una vez obtenidos procedimos a la hibridación de las cadenas complementarias (*forward* y *reverse*) para cada siRNA. Para ello mezclamos

- 2 µl de los oligos *forward* y *reverse* a una concentración final de 10µM (stock 250µM)
- 48 µl de tampón de hibridación o agua

Incubamos la mezcla 4 minutos a 95°C, inmediatamente después 10 minutos a 70°C, después se deja enfriar la mezcla lentamente en el mismo baño donde la calentamos.

- Tampón de hibridación:
- 100mM acetato de potasio
  - 30mM HEPES pH7,4
  - 2mM acetato de magnesio

Los dúplex obtenidos los fosforilamos en sus extremos mezclando;

- 5 µl de los oligonucleótidos hibridados
- 12 µl de agua
- 2 µl del tampón de la ligasa T4 (que normalmente contiene 1mM ATP)
- 1 µl de PNK quinasa (polinucleótido quinasa)

Incubamos la mezcla 30 minutos a 37°C y 10 minutos a 70°C para inactivar la PNK.

Los dúplex obtenidos se clonaron directamente en el vector pLVTHM digerido previamente con los enzimas de restricción Mlu I y Cla I:

- 5  $\mu$ l de los oligos fosforilados
- 1  $\mu$ l del vector digerido (20-100ng)
- 11  $\mu$ l de agua
- 2  $\mu$ l de tampón de la ligasa T4
- 1  $\mu$ l de la ligasa T4 (1-5 U)

### 3 Producción de partículas lentivirales y transducción de células

Los vectores lentivirales permiten introducir de manera eficiente, integrar y expresar de forma estable transgenes en células quiescentes y proliferantes, tanto *in vitro*, como en numerosos órganos *in vivo*.

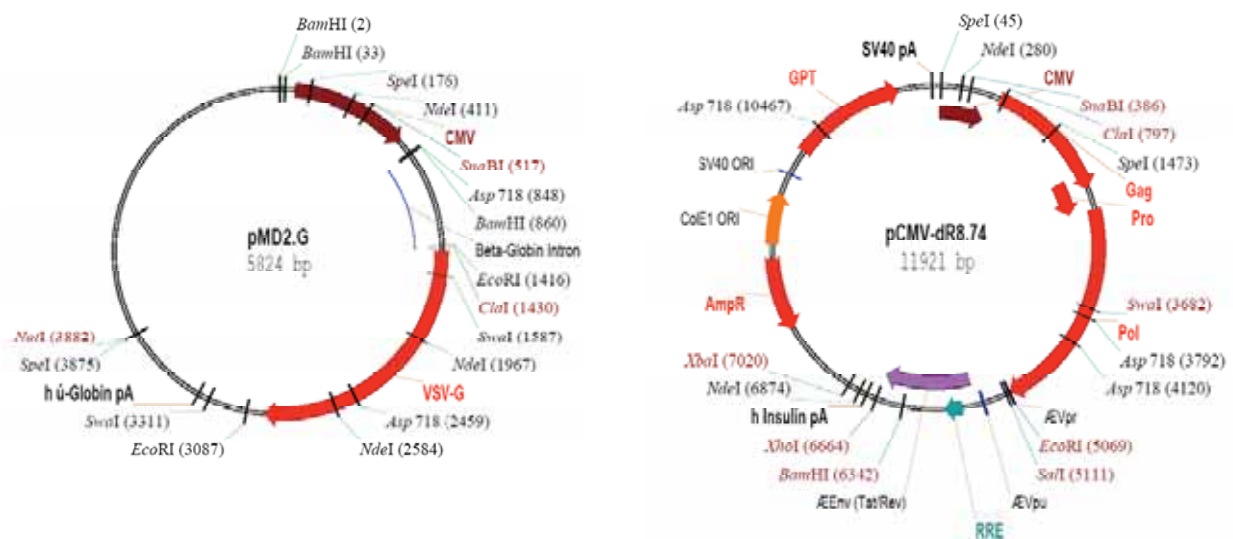
Las partículas lentivirales se generan mediante la coexpresión de elementos de empaquetamiento del virión y el genoma vírico recombinante (codificados en el vector) en una célula usada como “productora”, normalmente las Hek293 o Hek293T. En el caso de los vectores basados en el HIV-1 los componentes centrales y enzimáticos del virión (elementos de empaquetamiento) proceden del HIV-1, mientras que la envuelta deriva de un virus heterólogo, normalmente el virus de la estomatitis vesicular (VSV), por su estabilidad y el amplio tropismo de su proteína G. Existen tres generaciones de los elementos de empaquetamiento derivados de HIV-1, para la producción de vectores lentivirales en las que se han hecho sucesivas deleciones de los genes del HIV-1 para eliminar su capacidad de replicación. En esta tesis hemos usado los de 2ª generación, en los que se ha eliminado los genes de la envuelta y todos los genes auxiliares del HIV-1 (vpr, vif, vpu y nef)

En genoma vírico recombinante es el único material genético que se transferirá a las células diana, que es el que contiene clonado el transgen o la secuencia que genera los siRNA, flanqueado por los elementos necesarios que actúan en *cis* para la encapsidación, la transcripción reversa y la integración en el genoma. Además, los vectores estándar contienen el elemento regulador posttranscripcional WPRE (*woodchuck hepatitis virus*) para incrementar la expresión del transgen, así como el elemento cPPT (*central polypurine tract*) que actúa en *cis* y que mejora la eficiencia de transferencia del transgen en muchas dianas

#### 3.1 Obtención de las partículas lentivirales

Una vez obtenidos los plásmidos con los insertos deseados (apartado 2.3 de los Materiales y Métodos), el siguiente paso en la generación de los vectores lentivirales es la producción de las partículas virales que actuarán como vehículo de DNA de interés.

La producción de estas partículas la realizamos en células Hek293T a las que transfectamos con los vectores que contienen los genes virales necesarios para la síntesis de la envuelta (pMD2G) y las proteínas de empaquetamiento (pCMVdR8.74) así como el genoma vírico modificado que incluye en DNA de interés (vector de transferencia pWPXL, en el caso de transgenes, o pLVTHM en el caso de los siRNA). Todos los vectores fueron cedidos por el laboratorio del doctor D. Trono de la “Université de Genève” ([www.tronolab.com](http://www.tronolab.com)).



**Figura 6.** Mapas de los vectores pMD2G y pCMVdR8.74 donde se muestran los principales elementos de los vectores. Obtenidos de [www.tronolab.com](http://www.tronolab.com)

Brevemente el procedimiento consiste en transfectar las células Hek293T por el método de fosfato cálcico o el método PEI (ver apartado 1.9.2 de la sección Materiales y Métodos), y recoger el medio de la placa transfectada que contiene las partículas virales, el segundo y tercer día después de la transfección. Estos medios se pueden usar directamente para transducir las células diana, ser congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$ , o bien se concentran por ultracentrifugación. A continuación muestro el protocolo detallado:

**DIA 0:** Plaquear las células Hek293T en 6 placas de 10 cm de diámetro de tal manera que al día siguiente estén confluentes (90-100%)

**DIA 1:** Transfección eficiente de los vectores (la calidad del título obtenido depende de esta transfección, la eficiencia debe ser mayor del 75% de células transfectadas). Usaremos el método de fosfato cálcico o el método PEI.

- 10  $\mu\text{g}$  del DNA
- 7  $\mu\text{g}$  de pCMVDR7.8
- 3  $\mu\text{g}$  de pMD2G

Mediante el método de fosfato cálcico: Por cada placa de 10 cm de diámetro, mezclar el DNA y llevar a 250  $\mu\text{l}$  con  $\text{H}_2\text{O}$ , añadir 250  $\mu\text{l}$  de la solución de calcio, homogeneizar y añadir 500  $\mu\text{l}$  de la solución fosfato con burbujeo. Esperar 15-20 minutos a temperatura ambiente y añadir despacio a las células.

Mediante el método PEI: Mezclar el DNA y llevar a 1560  $\mu\text{l}$  con NaCl 150 mM estéril, añadir 78  $\mu\text{l}$  de PEI (1mg/ml pH7), agitar fuertemente con ayuda de vórtex durante 15-20", y añadir a la placa de 10 cm de diámetro tras 15-20 minutos.

La transfección es mejor hacerla o bien a última hora de la tarde y cambiarles el medio por la mañana temprano (DIA2), o bien a primera hora de la mañana y cambiarles el medio a las 7-8 horas. Cuando cambiemos el medio añadiremos 5 ml en lugar de 10 ml y dejaremos las placas a  $33^{\circ}\text{C}$  (los lentivirus son más estables a esta temperatura).

DIA 3: Al día siguiente (24 horas después) se recoge el medio de las placas, se guardan a 4°C y le vuelvo a añadir 5ml más. Estos medios es mejor guardarlos sin restos celulares, centrifugando a 2500 rpm a 4°C y filtrando después con filtros de 0.45 µm

DIA 4: Al día siguiente, se recogen los medios otra vez, se centrifugan (en total, tendremos 60 ml por construcción) a 2500 rpm 10 min. a 4°C y después se filtran con filtros de 0.45 µm. Entonces se coloca en los en los tubos de ultracentrifuga (Beckman Konical tubes ref 358126) (24 ml/tubo), añadimos un cojín de 4ml sacarosa 20% usando un jeringuilla sobre el fondo del tubo de tal manera que las dos fases (sacarosa en el fondo y medio encima) quedan bien separadas y se centrifuga a 26000rpm 1h30min a 4°C. Después se aspira el medio con cuidado y volcamos el tubo para vaciar completamente el contenido cuando quedan 2-3 ml sacarosa. Se dejan secar boca abajo en un trozo de papel (aproximadamente entre 5-10 min.). Resuspendo en 75-200µl DMEN Penicilina/estreptomicina sin FBS. Es importante resuspender durante al menos 1 minuto para asegurar que no quedan partículas virales enganchadas en las paredes pero con cuidado de no hacer espuma Con este concentrado obtengo 2-6 x 10<sup>7</sup> U/ml titulando sobre 100.000 células Hela mientras que el medio (sin concentrar) nos queda entre 200.000 y 400.000 U/ml. Si la titulación la hacemos en 293T el título aumenta entre 15-20 veces.

Es importante que el medio que añado a las células Hek293T tras la transfección contenga Hepes para tamponar el pH ya que el medio que se acidifica mucho.

Normas de bioseguridad:

El trabajo con vectores lentivirales se hace en condiciones estándar de bioseguridad de nivel 2 según las normas de la 4ª edición del “CDC Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories” (*U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health, 1999*). En el caso de esta tesis, se ha trabajado en un espacio especialmente habilitado para trabajar con vectores virales en la sala de cultivos de los Servicios Científicos Comunes del Parque Científico de Barcelona.

### 3.2 Titulación de las partículas lentivirales

La titulación de las preparaciones lentivirales se puede hacer en distintos tipos celulares, aunque normalmente, debido a su fácil manipulación, se suele hacer en células HeLa o Hek293T. El procedimiento que usamos consiste en determinar el nº de células infectadas por ml de preparación de virus. En el caso de los vectores usados en esta tesis (pLVTHM y pWPXL) contienen GFP (*green fluorescent protein*), por lo que esta determinación se hizo por citometría de flujo, calculando el porcentaje de células que expresan GFP usando los protocolos del “Servicio de Citometría de Flujo” de los “Servicios Científico-Técnicos” de la Universidad de Barcelona.

DIA 0: Sembramos en cada pozo de placas 6well, 10<sup>5</sup> células HeLa o Hek293, tras 5-6 horas añadimos distintos volúmenes de la preparación viral (diluida o concentrada)

DIA 1: A las 24 horas cambiamos el medio por medio fresco

DIA 3 o 4: A los 3 o 4 días de la infección se lavan las células con PBS y se tripsinizan con 250 µl de tripsina/EDTA durante 2-3 minutos. Después añadimos 250 µl de paraformaldehído 3% (fija e inactiva la partículas víricas que puedan quedar libres), se resuspenden las células y se analiza la expresión de GFP mediante citometría de flujo (*flow cytometry*)(permite analizar miles de células por segundo en tiempo real y es capaz de separar y cuantificar partículas con determinadas propiedades, como su fluorescencia emitida ante la excitación por un láser determinado)

El título se calcula

$$293T \text{ TU/ml} = \text{n}^\circ \text{células plaqueadas} \times \frac{\% \text{ células GFP/100}}{\text{ml solución viral usada}}$$

Para el cálculo sólo utilizamos las diluciones con un porcentaje de células positivas para GFP situado entre el 5 y el 20% ya que en porcentajes superiores al 20% se incrementa notablemente la probabilidad de tener células infectadas por dos partículas virales y por debajo del 5% la medida del citómetro de flujo no es fiable.

### 3.3 Transducción de células 3T3L1 usando partículas lentivirales

Para transducir los preadipocitos o adipocitos 3T3L1 procedimos como para la titulación en células Hek293T. Pero en este caso, probamos distintas multiplicidades infectivas (MOI: indica el número de unidades infectivas necesarias para transducir una célula diana) basándonos en el título obtenido en las células HeK293T para cada partícula viral. (ver apartado 2.2 y 2.3 de los métodos). Brevemente,

DIA0: sembramos 20.000 células por pozo de placas 6well, tras 4-5 horas añadimos 8 µg/ml del reactivo *polybrene*. Dos horas después añadimos la cantidad de la solución de partículas víricas necesaria para conseguir la MOI calculada, y dejamos las placas a 33°C (las partículas víricas son más estables a esta temperatura)

DIA1: A las 12 horas cambiamos el medio por medio fresco.

DIA7: Una semana después podemos tripsinizar las células, posteriormente, se para la reacción de tripsinización añadiendo medio completo. La suspensión celular se usa para ver su porcentaje de infección mediante citometría de flujo (mediante un protocolo que permite clasificar las células según su grado de fluorescencia) y/o seleccionar las células infectadas que expresan GFP mediante la metodología del FACS (*fluorescence activated cell sorting*).

Estas determinaciones se han hecho en el "Servicio de Citometría de Flujo" de los "Servicios Científico-técnicos" de la Universidad de Barcelona, siguiendo los protocolos recomendados por el personal del servicio.

## 4 Técnicas de microscopía

### 4.1 Obtención de láminas de membrana plasmática de células crecidas sobre cubreobjetos

#### Materiales y reactivos:

- Tampón KHMgE (pH 7,5)
  - KCl 70mM
  - HEPES 30mM
  - MgCl<sub>2</sub> 5mM
  - EGTA 3mM
- Tampón KHMgE 1/3: Es una dilución 1/3 del tampón KHMgE en agua bidestilada
- Paraformaldehido 3% en PBS
- KCN 0,2M en agua bidestilada (100x)

### Procedimiento:

1. El protocolo se realiza a partir de adipocitos 3T3L1 crecidos y diferenciados sobre cubreobjetos de 10mm de diámetro estériles colocados en placas de 10cm Ø o en pozos de placas *6well*. Para esterilizar los cubreobjetos se someten a luz ultravioleta durante 20 minutos o alternativamente se dejan en una estufa a 60°C durante al menos 12 horas.

2. El día del experimento colocamos cada cubreobjetos (sobre el cual se encuentran los adipocitos crecidos) en un pozo de placas *24well*. Es aquí donde incubamos las células con los tratamientos o sustancias deseadas: ayuno, tratamientos descolesterolizantes, tratamientos con insulina... Generalmente para hacer estas incubaciones añadimos a cada pozo 0,5 o 1ml de la solución de incubación.

3. Se tratan las células con KCN 2mM haciendo una dilución 1/100 en el mismo pozo donde se encuentra el cubreobjetos durante 5 minutos. A partir de ahora colocaremos la placa *24well* que contiene los cubreobjetos con los adipocitos sobre un soporte frío (sobre hielo) y todas las soluciones deberán estar también frías (4°C)

4. Aspiramos el medio y lavamos las células con PBS frío.

5. Seguidamente incubamos durante 5 minutos con KHMgE 1/3. Al incubar las células con este medio hipotónico, estas se hinchan debido a la entrada de agua en el interior celular.

6. Vaciamos la placa volcándola directamente, y añadimos 2ml por pozo de tampón KHMgE.

7. Los fragmentos de membrana plasmática (*plasma membrane lawns*) se obtienen abocando directamente sobre las células el tampón KHMgE que hemos añadido a cada pozo con la ayuda de una pipeta *pasteur* de plástico con una punta amarilla cortada por el extremo hasta que se observa que el cubreobjeto queda totalmente transparente. Al añadir de nuevo la solución isotónica la membrana de las células es más frágil y resulta fácil romper las células mediante el pipeteo del tampón sobre ellas de tal manera que quedan adheridos a la placa los fragmentos de membrana de los adipocitos y queda expuesta la cara intracelular de las membranas.

8. Una vez hemos obtenido los fragmentos de membrana plasmática lavamos dos veces con KHMgE y los fijamos con paraformaldehído (PFA) 3% durante 30 minutos.

9. A partir de este momento las láminas de membrana plasmática, ya están preparadas para iniciar el protocolo de inmunolocalización.

## **4.2 Tinción “Oil Red O”**

Esta técnica se utiliza para teñir triacilglicérol de células fijadas. Su visualización se realiza a través de un microscopio óptico con contraste de fases.

### Materiales y reactivos:

- Oil Red O (Sigma O-0625)
- Solución sobresaturada de Oil Red O en isopropanol al 65%
- Isopropanol 65%
- Agua bidestilada

### Procedimiento:

1. Partimos de células crecidas sobre cubreobjetos o directamente sobre soportes de cultivos, y fijadas en paraformaldehído 3% (ver apartado 4.3). Después de la fijación lavamos las células tres veces con PBS para eliminar los restos de paraformaldehído.



2. Lavamos las células muy rápido (15-20 segundos) con isopropanol 65% y teñimos las células durante 15-30 minutos con una solución sobresaturada de Oil Red O en isopropanol al 65% previamente filtrada.

3. Transcurrido este tiempo hacemos otro lavado rápido con isopropanol 65% y finalmente realizamos tres lavados con agua bidestilada.

### **4.3 Inmunolocalización de proteínas sobre células crecidas en cubreobjetos**

La inmunocitoquímica nos permite localizar diferentes moléculas, mayoritariamente proteínas, en una estructura celular mediante la reacción específica entre antígeno-anticuerpo. Se basa principalmente en el reconocimiento de las cadenas pesadas del anticuerpo primario (que reconoce la proteínas de interés) por un anticuerpo secundario que está conjugado a un fluorocromo. En la actualidad hay una gran variedad de compuestos fluorescentes. En esta tesis se han usado anticuerpos secundarios de cabra contra conejo (*rabbit*), ratón (*mouse*) o cobaya (*guinea-pig*) conjugados con los fluorocromos AlexaFluor-568 o AlexaFluor488 que presentan longitudes de onda de excitación y emisión diferentes. Esta característica permite la realización de dobles marcajes y por tanto, la localización simultánea de al menos dos proteínas diferentes.

En esta técnica, se ha de tener en cuenta la correlación existente entre la concentración de anticuerpo, su afinidad por el antígeno y la concentración del antígeno en la célula. Así, por ejemplo, con un antígeno abundante y en áreas localizadas, el anticuerpo debe estar muy diluido, y siempre un anticuerpo de baja o media afinidad producirá una reacción intensa. En cambio, cuando el antígeno se encuentra en bajas concentraciones, el anticuerpo ha de estar menos diluido, y un anticuerpo de baja o media afinidad puede que no lo detecte claramente. Por tanto, la concentración del anticuerpo en la solución de incubación es un parámetro modificable que se ha de poner a punto para cada tipo celular. Normalmente comenzaremos con diluciones aproximadamente 10x de las usadas para detectar la misma proteína por western blot.

Otro factor a tener en cuenta durante la puesta a punto de este método es el tipo de detergente, concentración y tiempo de exposición, que se emplea para permitir la entrada y solubilización del anticuerpo en la célula (permeabilización). Estos parámetros dependen fundamentalmente, del anticuerpo primario empleado y se han de determinar empíricamente. En nuestro caso hemos usado siempre el detergente Tritón-X-100 (forma poros permanentes en la membrana) a una concentración del 1%(v/v) durante 10 minutos.

Para reducir el riesgo de inmunolocalizaciones artefactuales, se han de realizar diversos controles en cada experimento, añadiendo condiciones de:

- Control celular:
  - Células no transfectadas (en el caso de que estemos trabajando con células transfectadas) o transfectadas con una construcción irrelevante.
  - Células sin tratar (en el caso de que estemos trabajando bajo algún tratamiento)
- Control de los anticuerpos:
  - Sin anticuerpo
  - Con un anticuerpo irrelevante
  - Sólo el anticuerpo primario
  - Sólo el anticuerpo secundario
  - Control positivo si existe

Además, para cada condición experimental, usaremos 3 o 4 cubreobjetos para comparar entre ellos los resultados obtenidos y descartar artefactos puntuales.

Materiales y reactivos:

- Solución de fijación: Paraformaldehído (PFA) 3% en PBS
- NH<sub>4</sub>Cl 50mM en PBS
- Glicina 20mM en PBS
- Solución de permeabilización: Tritón-X-100 0,1% (v/v) en PBS
- Solución de bloqueo: FBS 10% (v/v) en PBS
- Anticuerpos primarios:
  - anti-caveolina-1 (Santa Cruz Biotechnology)(*rabbit*): dilución 1:200 en solución de bloqueo. Se prepara y se mantiene en hielo
  - anti-caveolina-1 (Transduction Laboratories)(*rabbit*): dilución 1:400 en solución de bloqueo
  - anti-GLUT4 purificado por proteína A (*rabbit*): dilución 1:200 en solución de bloqueo.
  - anti-perilipina (Upstate biotechnology)(*guinea pig*): dilución 1:200 en solución de bloqueo
  - anti-flotilina-1 (Transduction Laboratorios)(*mouse*): Dilución 1:50 en solución de bloqueo.
- Anticuerpos secundarios generados en cabra, específicos para conejo (*rabbit*), ratón (*mouse*) y cobaya (*guinea pig*) y conjugados con el fluorocromo AlexaFluor488 (verde) o AlexaFluor568(rojo).(Molecular Probes).
- Medio de montaje: *Mowiol*. La fluorescencia decrece rápidamente cuando el fluorocromo se excita con luz ultravioleta, este medio mantiene considerablemente la fluorescencia y permite mantener las preparaciones a 4°C durante unos dos meses.

Procedimiento:

1. El protocolo se realiza a partir de adipocitos crecidos y diferenciados en cubreobjetos de 10mm de diámetro estériles, o después de la obtención de fragmentos de membrana plasmática (apartado 4.1)
2. Los cubres se pasan individualmente a los pozos de una placa *24well* y se lavan dos veces con PBS. Es importante controlar siempre la orientación de las células (expuestas) y evitar añadir las soluciones directamente sobre ellas.
3. Posteriormente se fijan con paraformaldehído 3% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente, y se lavan tres veces con PBS. En este punto, los cubreobjetos pueden guardarse a 4°C y continuar al día siguiente.
4. Para disminuir la autofluorescencia de las células debida al proceso de fijación, se bloquean durante 10 minutos con NH<sub>4</sub>Cl 50mM en PBS.
5. Pasado este tiempo se aspira la solución del pozo donde se encuentra el cubreobjetos y se añade la solución Glicina 20mM en PBS durante otros 10 minutos para eliminar los restos de NH<sub>4</sub>Cl.
6. Se procede a la permeabilización de la célula mediante la incubación con Tritón-X-100 0,1% en PBS durante 10 minutos. Este paso no es necesario si partimos de fragmentos de membrana plasmática.
7. Se realizan tres lavados con PBS y procedemos al bloqueo de las uniones inespecíficas del anticuerpo primario o el secundario, añadiendo la solución de bloqueo (10% FBS en PBS) durante al menos 30 minutos.
8. Durante el tiempo de bloqueo se preparan las diluciones de los anticuerpos primarios en PBS-10%FBS, en tubos eppendorf. Se calculan 25µl de solución por cubreobjeto (como hemos mencionado, las diluciones que se usan se determinan empíricamente para cada

anticuerpo, y se puede comenzar por una dilución 10x que la que se utiliza para *western blot*). La solución de anticuerpo se centrifuga 5 minutos a máxima velocidad en una centrífuga de mesa a 4°C para descartar posibles agregados de anticuerpo.

9. La incubación de las células con la dilución del anticuerpo primario se lleva a cabo sobre un fragmento de parafilm limpio, encima del cual se depositan 25 µl de la solución del anticuerpo que queda como una gota. Se saca el cubre de la placa con ayuda de una pinzas finas, se secan un poco apoyando el lateral del cubreobjetos sobre un papel de filtro absorbente, y se coloca sobre la gota de anticuerpo con las células mirando a la solución. El tiempo de incubación es de 45 minutos-1hora a temperatura ambiente. En este punto podemos incluir controles negativos como los mencionados anteriormente, incubando con un anticuerpo irrelevante o directamente con el anticuerpo secundario.

10. Colocamos de nuevo los cubreobjetos en la placa de 24 pozos y realizamos tres lavados de 5 minutos con PBS.

11. La incubación de las células con la dilución del anticuerpo secundario se lleva a cabo de la misma manera que el primario (puntos 8 y 9). El tiempo de incubación es de 45 minutos a temperatura ambiente y protegidos de la luz ya que el fluorocromo unido al anticuerpo secundario es fotosensible. A partir de ahora las muestras se mantienen protegidas de la luz.

12. De nuevo pasamos los cubreobjetos a la placa de 24 pozos y hacemos tres lavados de 5 minutos con PBS. Posteriormente los colocamos encima de un papel absorbente (las células mirando hacia arriba) y dejamos que se sequen a temperatura ambiente y protegidos de la luz.

13. Finalmente procedemos al montaje de los cubreobjetos, añadiendo gotas de 5-10 µl de Mowiol sobre el portaobjetos, y colocando el cubreobjetos con las células hacia la solución de montaje, sobre cada gota. Los dejamos secar durante una noche en posición horizontal y los guardamos a 4°C protegidos de la luz.

14. La observación de las muestras se ha realizado en un microscopio de fluorescencia confocal Leica TCS 4D láser, con un objetivo de 63 aumentos en el "Servicio de Microscopía Confocal" de los "Servicios Cientifictécnicos" de la Universidad de Barcelona.

## 4.4 Técnicas de microscopía electrónica

La realización de estas técnicas ha sido posible gracias a la colaboración de la Dra. Carmen López Iglesias y Sònia Ruiz, de los "Servicios Cientifictécnicos" de la Universidad de Barcelona.

### 4.4.1 Preparación convencional para microscopía electrónica de transmisión.

#### Materiales y reactivos:

- Microscopio electrónico de transmisión Hitachi 600 AB
- Paraformaldehído 2% en PB 0,1M pH 7,4
- Glutaraldehído 2,5% en PB 0,1M pH7,4
- PB 0,1M pH7,4
- Tetraóxido de osmio 1% en PB 0,1M
- Agua bidestilada
- Acetona (50%, 70%, 96% en agua, y 100%)
- Acetato de uranil 2% en agua
- Citrato de plomo
- Spurr, resina epoxi (EMS, Electrón Microscopy Sciences)
- Piramidotomo (Leica Em Trim)
- Ultramicrotomo (Leica UCT)

- Cuchilla de vidrio
- Cuchilla de diamante DIATOME
- Rejillas de cobre recubiertas con Formvar-C

Procedimiento:

1. Fijación de la muestra (fracciones celulares, células enteras...) con glutaraldehído 2,5% o bien con una mezcla de paraformaldehído 2% / glutaraldehído 2,5% durante 1 hora a 4°C.
2. Posteriormente la muestra se limpia con el tampón PB 0,1M durante 2 horas realizando cambios cada 15 minutos.
3. Después de los lavados se realiza una postfijación con tetraóxido de osmio 1% en PB 0,1M durante 1 hora a 4°C.
4. Después de la fijación, se realiza un lavado con agua durante 30 minutos. Seguidamente se vuelve a lavar la muestra con tampón PB 0,1% durante 2 horas realizando cambios cada 15 minutos.
5. La muestra se deshidrata con acetona mediante cambios a concentraciones crecientes de acetona en agua: 1 hora con acetona al 50% (con dos cambios)-70%-90% y finalmente 2 horas con acetona 100%.
6. Se realiza la inclusión en resina Spurr mediante cambios a proporciones mayores de resina, incubando sucesivamente durante dos horas en las mezcla con las proporciones resina-acetona: 1:3, 2:2 y 3:1. Finalmente se añade resina pura durante dos horas con dos cambios.
7. Después se procede a la polimerización de la resina a 60°C durante 48 horas.
8. Ultramicrotomía: una vez polimerizados los bloques se piramidizan para obtener una cara pequeña a partir de la cual se realizan secciones finas en un ultramicrotomo (Leica, UCT). Primero se realizan cortes semifinos de 1µm para poder localizar la zona deseada en un microscopio óptico. Posteriormente se realizan cortes ultrafinos, de 50-60 nm que se recogen en rejillas de cobre recubiertas con Formvar y carbono.
9. Las secciones obtenidas se contrastan con acetato de uranilo al 2% en agua durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después se lava la muestra con agua abundante y se contrasta con citrato de plomo durante 5-6 minutos en presencia de lentejas de NaOH y en una atmósfera cerrada en ausencia de CO<sub>2</sub>.
10. La observación al microscopio electrónico de transmisión se realizó a 80Kv. Las placas fotográficas fueron escaneadas y procesadas mediante el programa IMAT de los Servicios Científicotécnicos de la Universidad de Barcelona.

#### 4.4.2 Preparación de criosecciones

Materiales y reactivos:

- Paraformaldehído 2% en PB 0,1M pH 7,4
- Paraformaldehído 2% + Glutaraldehído 0,125% en PB 0,1M pH 7,4
- PB 0,1M pH7,4
- Glicina 50mM en PB 0,1M
- Gelatina 10%
- Sacarosa 2,3M
- Nitrógeno líquido
- Portamuestras PINS para montar las muestras en frío
- Crioultramicrotomo Leica UCT + FCS (cámara de frío)

Procedimiento:

1. Fijamos con paraformaldehído 2% en PB 0,1M pH 7,4 o bien con paraformaldehído 2% + Glutaraldehído 0,125% en PB 0,1M pH 7,4, las células crecidas sobre una placa de cultivos (60mm de diámetro) o sobre cubreobjetos, durante 20-30 minutos a temperatura ambiente. Cambiamos el fijador por fijador fresco y lo dejamos 1-2 horas en agitación a 4°C.
2. Recogemos las células con un *scraper* procurando no pasar dos veces por la misma zona para no romper las células, y las colocamos en un tubo eppendorf.
3. Precipitamos las células a baja velocidad (50g) y cambiamos el fijador por paraformaldehído 2% (pueden estar 2-3 días con este fijador)
4. Para lavar las células, centrifugamos el tubo a 8000 rpm durante 1 minuto y eliminamos el fijador. Añadimos 1ml de glicina 50mM en PB 0,1M. Repetimos 4-5 veces.
5. Extraemos el máximo de la solución de glicina y colocamos las células en un incubador a 37°C donde previamente habíamos dejado gelatina al 10% y unas pipetas de plástico. Trabajando dentro del incubador, agitamos las muestras para resuspenderlas y añadimos 0,5ml de gelatina al 10%. Agitamos enérgicamente y dejamos reposar 5-10 minutos.
6. En una centrífuga horizontal centrifugamos las muestras a 9500 rpm durante 1 minuto y extraemos el exceso de gelatina. Seguidamente lo dejamos a 4°C hasta que observemos que la gelatina se ha solidificado.
7. Cortamos el fondo del tubo eppendorf con ayuda de un bisturí. Colocamos el *pellet* de células con gelatina sobre un portaobjetos recubierto con parafilm (añadimos unas gotas de glicina 50mM) y colocamos todo el conjunto sobre una superficie de vidrio que esté a 4°C.
8. Con un bisturí cortamos los bloques del tamaño adecuado
9. Colocamos los bloques en un eppendorf que contenga 1ml de sacarosa 2,3M a 4°C y se deja 2-3 horas en un orbital en la cámara fría.
10. Colocamos los bloques en los PINS (previamente los PINS se han lavado con acetona, se han dejado secar a 60°C y se han atemperado). Se saca el exceso de sacarosa con un papel *Watman* y se congelan en nitrógeno líquido.
11. El siguiente paso consiste en la obtención de cortes ultrafinos mediante el ultramicrotomo Leica UCT + FCS (cámara fría). Las secciones obtenidas se pican con metilcelulosa/sacarosa (1:1 500µl de sacarosa 2,3M y 500µl de metilcelulosa, en este orden) o (2:3 600µl de sacarosa 2,3M y 400µl de metilcelulosa en este orden). Esta solución se ha de preparar fresca.
12. Finalmente se descongelan los cortes y se coloca la gota encima de una rejilla, que se guarda a 4°C hasta su utilización.

#### 4.4.3 Técnica de *freeze-drying* (*freeze-etching*)

Se define como un método para la preparación de muestras para microscopía electrónica, en que la replica se obtiene a partir de una muestra que ha sido rápidamente congelada y luego fracturada a lo largo de los planos naturales de rotura para revelar su estructura interna. Esta técnica es idónea para la observación tridimensional de ciertas estructuras: membrana plasmática, vesículas, depresiones y red de clatrina, caveolas, filamentos del citoesqueleto...

Básicamente el protocolo se divide en cuatro pasos:

1. Criofijación (*rapid freezing*) de la muestra (método de impacto): consiste en la congelación rápida de la muestra mediante la proyección sobre un bloque de cobre, enfriado con nitrógeno líquido que permite la formación de estructura de gel amorfo.

2. Criosecado (freeze drying): consiste en la extracción del agua congelada por sublimación (paso del agua en fase sólida, gel, a fase vapor) controlada en una cámara de vacío. El vapor de agua es constantemente recogido por una bomba de vacío, manteniendo la presión de vapor por debajo de su nivel de equilibrio de manera que haya una pérdida de hielo (sublimación) continua desde la superficie de la muestra.

3. Obtención de réplicas: la muestra es sombreada o metalizada con platino/Carbono (Pt/C). El sombreado es rotatorio (136 rpm), primero con Pt con un ángulo pequeño (23°) y después con C (75°) en una unidad de *freeze-drying*.

4. Limpieza y digestión de las réplicas: depende del material de la muestra. Normalmente se hace con lejía, si se ha hecho una inmucitoquímica con oro coloidal la digestión no es completa y se realiza con agua durante más tiempo. En este último caso, el oro se observa por transparencia a través de la réplica.

#### Materiales y reactivos:

- Equipo para la criofijación por impacto (*slam-freezing*): Cryovacublok de Leica
- Lupa para montar las muestras
- 10% metanol
- Agua bidestilada
- Nitrógeno líquido
- Dewar de nitrógeno líquido para almacenar las muestras.
- Equipo *Bal-Tec BAF-060 freeze-etching system* con cañones de electrones y bomba de vacío turbomolecular
- Lejía
- Rejillas de cobre recubiertas de la resina Formvar.

#### Procedimiento:

1. Se parte de fragmentos de membrana plasmática de adipocitos 3T3L1 crecidos sobre cubreobjetos (apartado 4.1) y fijados con glutaraldehído 2,5% en PBS durante 20-30 minutos.

2. Después de la fijación de los cubreobjetos se lavan con agua bidestilada, se crioprotegen con 10% metanol y se rompen en 3 o 4 fragmentos.

3. Posteriormente se realiza la criofijación de los fragmentos de membrana plasmática mediante el método de "*slam-freezing*" o criofijación por impacto contra un bloque de cobre enfriado con nitrógeno líquido. Este proceso implica la utilización del Cryovacublock Leica. El fragmento de cubreobjetos se coloca encima de un soporte de espuma de alta densidad sujeto al émbolo del Cryovacublock con una cinta adhesiva de doble cara.

4. El exceso de agua del cubreobjetos se seca con una membrana de nitrocelulosa justo antes de que se proyecte contra el bloque de cobre enfriado. Después, el cubreobjetos con el fragmento de membrana congelada se transfiere a una unidad de freeze-etching (BAF-060, Bal-Tec, Liechstein) para proceder al proceso de criosecado a -90°C y  $10^{-7}$  mbar de presión durante 90 minutos.

5. Las réplicas de la superficie interna de los fragmentos de membrana plasmática se obtienen evaporando de manera rotatoria (136 rpm) 1nm de platino mediante un cañón de electrones en un ángulo de 23°. Posteriormente la réplica se refuerza con 10nm de carbono utilizando el cañón de electrones en un ángulo de 75°.

6. La separación de la réplica del cubreobjeto se realiza con ácido fluorhídrico 30% y posteriormente la muestra se digiere con lejía durante 12 horas. Finalmente, las réplicas se lavan varias veces con agua bidestilada y se procede al montaje sobre rejillas recubiertas de la resina Formvar.

#### 4.4.4 Inmunolocalización de caveolina-1 sobre fragmentos de membrana plasmática sometidos a la técnica de freeze-drying

Para la inmunolocalización de proteínas sobre fragmentos de membrana plasmática que observaremos por microscopía electrónica, seguiremos el protocolo 4.3, aunque en este caso la solución de bloqueo y donde diluimos los anticuerpos primario y secundario es PBS - 0,1% (w/v) BSA. Además, en este caso los anticuerpos secundarios no están conjugados a fluorocromos sino a oro coloidal de distintos diámetros (10, 15 o 20 nm) si es que queremos marcar más de una proteína.

Después del marcaje los fragmentos de membrana plasmática que están sobre los cubreobjetos son fijados en glutaraldehído 2,5% en PBS durante 20-30 minutos y se generan las réplicas de la membrana plasmática mediante la técnica de freeze-drying tal y como se indica en el apartado 4.4.3. Sin embargo, para los ensayos de inmunolocalización, las réplicas no se digieren al final con lejía, sino que se lavan con agua bidestilada durante 4 días para preservar el oro coloidal unido a la muestra. El oro coloidal se detecta por transparencia ya que es electrodenso.

## 5 Ensayos metabólicos y bioquímicos

### 5.1 Medida del transporte de glucosa en adipocitos 3T3L1

La medida del transporte de glucosa en adipocitos 3T3L1 se ha realizado en placas de 6 pozos (placas *6well*) usando el análogo no metabolizable 2-deoxiglucosa. El ensayo siempre se realiza por triplicado.

#### Materiales y reactivos:

##### - **Tampón Krebs-Ringen-HEPES pH7,4 (KRHB)**

Este tampón se prepara fresco a partir de las soluciones concentradas:

Solución A: NaCl	360mM (8g en 50 ml de agua)
Solución B: KCl	118mM (1,765g en 50ml de agua)
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	118mM (1,46 g)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	470 mM (0,805 g)
Solución C: CaCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	250mM (1,865 g en 50ml de agua)

Para preparar 100ml de KRHB pH7,4- 0,2%BSA:

HEPES 1,25 M (pH7,4)	1,6 ml
Solución A	5 ml
Solución B	1 ml
Solución C	1 ml
Piruvato sódico (200mM)(100x)	1 ml
BSA	0,2 g

- **Solución STOP:** 50mM de D-glucosa en PBS (2,25g de D-glucosa en 250 ml PBS). Esta solución se ha de mantener en hielo.

##### - **Solución de lisis:**

NaOH 0,1N

SDS 0,1%

- **Solución 2-deoxiglucosa fría: 5mM** (Pm=164,2) (0.0821 g en 100ml, alicuotada y guardada a -20°C)

- **2-deoxi[H<sup>3</sup>]glucosa (1mCi/ml)** ART-103A American Radiolabeled.

- <b>Solución de 2-deoxi[H<sup>3</sup>]glucosa</b> :Por placa de 6 pozos (placas <i>6well</i> ) preparamos	
2 deoxiglucosa fría 1mM	150μl
KRHB-0,2% BSA	600μl
2-deoxi[H <sup>3</sup> ]glucosa (10 μCi/ml)	6μl

- **Insulina 10 μM**: 8 μl de Insulina (5mg/ml) en 700 μl KRHB

Procedimiento:

1. Ayuno de las células: Lavamos las células tres veces con PBS para eliminar los restos de suero. A continuación, incubamos las células durante 2 horas con medio de ayuno (ver apartado 1.3.6) (2ml/pozo placa *6well*).

2. Lavamos las células tres veces con el tampón KRHB. Este lavado es importante ya que el medio de ayuno contiene mucha glucosa (25mM).

3. Añadimos 900 μl de tampón KRHB-0,2%BSA a 37°C a cada pozo de la placa *6well* (con las drogas a la concentración y tiempo adecuados si es el caso). Las incubaciones se realizan siempre a 37°C

4. Estimulación por insulina: Añadimos 9μl de insulina 10μM a los pozos deseados (concentración final 100nM) e incubamos durante 30 minutos a 37°C

5. COMIENZA EL TRANSPORTE: Añadimos 100μl de la solución radiactiva de 2-deoxi[H<sup>3</sup>]glucosa a cada pozo. A los 5 minutos se para el transporte añadiendo 5 ml/pozo de tampón STOP a 4°C, y dejando las células a 4°C.

6. Una vez se ha parado el transporte en todos los pozos, se realizan 3 lavados con tampón STOP para eliminar toda la radiactividad no incorporada a las células. Después del último lavado aspiramos bien el tampón y añadimos a cada pozo 800μl de tampón de lisis. Dejamos las placas agitando a temperatura ambiente durante 1 hora y después homogeneizamos los lisados pipeteando con una pipeta P-1000.

7. CONTAJE RADIATIVO: Dos fracciones de 250μl del homogenado celular se ponen en microviales de centelleo, se le añade 3ml de líquido de centelleo EcoLite y contamos la radiactividad incorporada a las células mediante un contador de partículas β.

Para medir la cantidad de radiactividad que aparece en las células de manera inespecífica, reservamos unos pozos donde añadimos la solución radiactiva después de haber añadido los 5ml del tampón STOP.

Para evaluar la cantidad de radiactividad total presente en cada pozo en el momento de la incubación, se ponen directamente 100μl de solución radiactiva en dos microviales de centelleo, son las llamadas cuentas totales (DPM total).

8. Con la finalidad de saber la cantidad total de proteína en cada pozo y poder después expresar la tasa de transporte en nmoles de 2-deoxiglucosa(2DG)/mg de proteína, se valora la cantidad de proteínas de 20μl de los homogenados de cada pozo por el método de Pierce.

9. Por último, para convertir los datos de dpm (descomposiciones radiactivas por minuto) a nmoles de 2DG/mg de proteína transportados en 5 minutos realizamos el cálculo:

$$\frac{\text{dpm vial} \times 800 \mu\text{l (volumen total)} \times 100 \text{ nmoles } 2\text{DG} \times 1000(\text{para referirlo a mg proteína})}{\text{DPM total} \times 250 \mu\text{l (volumen medido)} \times n (\mu\text{g proteína en } 20 \mu\text{l}) \times 40 (\text{factor corrección})}$$



## 5.2 Medida del transporte de glucosa durante la reversión de la acción de la insulina en células 3T3L1.

### Materiales y reactivos:

- Son los mismos que los del apartado 5.1 y además

#### - **Tampón Krebs-Ringer-MES pH6**

Para preparar 100ml mezclamos:

MES 10mM (Sigma M-8250)(Stock 0,5M) 2ml

Solución A 5ml

Solución B 1ml

Solución C 1ml

Piruvato sódico (200mM)(100x) 1ml

Una parte del tampón la suplementamos con 0,2% (w/v) de BSA

### Procedimiento:

1- Seguimos el mismo protocolo que en el apartado anterior (5.1) hasta el punto 4.

2- Una vez que las células han sido incubadas con los tratamientos (si es el caso) y estimuladas con insulina, las lavamos tres veces con 2 ml de Krebs-Ringer-MES pH6, así conseguimos separar la insulina de su receptor. Después, incubamos las células a diferentes tiempos con 2 ml de Krebs-Ringer-MES a pH6-0.2 % BSA a 37°C.

3. Una vez transcurridos los diferentes tiempos de incubación, lavamos las células con 2ml de KRHB pH7,4 y añadimos 900µl de KRHB-0,2%BSA pH7,4 calentado a 37°C, ya que para poder realizar el transporte en condiciones óptimas las células han de estar a pH 7,4

4. Comienza el transporte añadiendo 100µl de solución radiactiva de 2-deoxi[H<sup>3</sup>]glucosa a cada pozo.

5. El ensayo continua siguiendo el punto 5 del apartado anterior (5.1).

## 5.3 Medida de la lipogénesis de *novo* en adipocitos 3T3L1

Con este ensayo medimos la cantidad de glucosa incorporada a lípido en adipocitos 3T3L1 durante una hora y 30 minutos de incubación con glucosa metabolizable marcada radiactivamente. Este ensayo, como el de transporte de glucosa, lo realizamos usando adipocitos crecidos en placas *6well* y cada condición se realizó por triplicado.

### Materiales y reactivos:

- **Tampón Krebs-Ringer-HEPES pH7,4 (KRHB)** (descrito en el apartado 5.1). En este caso en vez de contener piruvato, contiene glucosa 5,5mM (0,001g/ml) (stock 100x)

- **Insulina 10 µM:** 8 µl de Insulina (5mg/ml) en 700 µl KRHB

- **[C<sup>14</sup>]Glucosa 0,5µCi/µl.** (Stock 200µCi/µl ) Hago la dilución 1/10 en medio KRHB, quedándonos a una concentración de 20µCi/µl, es decir 40 veces más concentrada. De esta solución añadiré 25µl/ml en cada pozo, que se corresponden con 1,6 nmoles de glucosa marcada por pozo de placa *6well*.

- **Reactivo DOLE:** Compuesto por 40 partes de Isopropanol, 10 de heptano y 1 de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Volumen / 51 \* partes; ej. 300/51\*40 ml de isopropanol)

Procedimiento:

1. Ayuno de las células: Lavamos las células tres veces con PBS para eliminar los restos de suero. A continuación, incubamos las células durante 2 horas con medio de ayuno (ver apartado 1.3.6) (2ml/pozo placa 6well).

2. Lavamos las células tres veces con el tampón KRHB. Este lavado es importante ya que el medio de ayuno contiene mucha glucosa (25mM).

3. Añadimos 965  $\mu$ l de tampón KRHB-0,2%BSA a 37°C a cada pozo de la placa 6well (con las drogas a la concentración y tiempo adecuados si es el caso). Las incubaciones se realizan siempre a 37°C.

4. Añadimos 10 $\mu$ l de insulina 10 $\mu$ M a los pozos deseados (concentración final 100nM) y 25 $\mu$ l de C<sup>14</sup>Glucosa 20 $\mu$ Ci/ $\mu$ l a todos los pozos (concentración final 0,5 $\mu$ Ci/ $\mu$ l). Incubamos a 37°C durante 1 hora y 30 minutos

5. La lipogénesis se detiene poniendo las placas en hielo, aspirando el medio y realizando dos lavados con PBS frío. Las placas se secan bien y se ponen a -80°C durante 5 minutos para lisar células.

6. La extracción de lípidos se realiza añadiendo 2ml del reactivo DOLE por pozo. La placa 6well se sella con parafilm y se deja agitando a temperatura ambiente durante al menos 2 horas.

7. Una vez transcurrido este tiempo, se recoge el sobrenadante mediante fuerte pipeteo y se coloca en tubos de 15ml donde previamente hemos añadido 800 $\mu$ l de agua y 1,2ml de heptano (este proceso, así como la adición del reactivo DOLE a las placas, se ha de realizar en la campana de extracción de gases)

8. Los tubos se agitan fuertemente mediante vórtex. Se dejan reposar durante 5 minutos.

9. Tomamos 800  $\mu$ l de la fase superior orgánica y los ponemos en microviales de centelleo donde añadimos 3 ml de líquido de centelleo EcoLite.

10. Para calcular los nmoles de glucosa incorporada a lípido en cada pozo realizamos el siguiente cálculo:

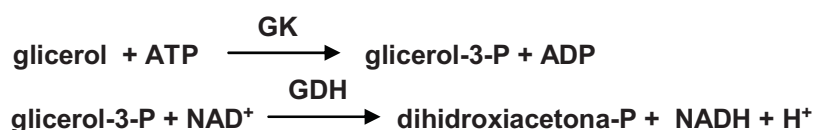
$$\frac{\text{dpm vial} \times \text{volumen de la fase orgánica (1,6ml)} \times \text{mmoles totales de glucosa (5,56)}}{\text{dpm totales añadidas a cada pozo} \times \text{volumen medido (0,8ml)}}$$

## 5.4 Determinación de la lipólisis

Para valorar la lipólisis medimos la cantidad de glicerol liberado al medio durante un periodo determinado (30 minutos o 1 hora). Para ello usamos dos tipos de ensayos, basados en reacciones químicas a partir del glicerol, cuyos productos son los que usamos para estimar la cantidad de glicerol liberada al medio.

### 5.4.1 Determinación del glicerol liberado a partir de la cantidad de NADH

Este método se fundamenta en las reacciones:





Primero llevaremos a cabo la reacción del enzima GDH para convertir en dihidroxiacetona -P + NADH todo el glicerol procedente de la glucólisis (no de la lipólisis) que está fosforilado.

En segundo lugar llevamos a cabo la reacción del enzima GK que genera glicerol-P a partir de glicerol, que posteriormente GDH convertirá en dihidroxiacetona-P y NADH que es lo que medimos por su absorbancia a 340nm.

10. En cubetas semimicro, añadimos 250  $\mu$ l de las soluciones patrón o de las muestras, por duplicado.

11. Añadimos 1ml del Tampón Completo, agitamos cada cubeta por inversión y leemos su absorbancia a 340nm (DO1).

12. Añadimos 13 $\mu$ l de la solución GKD (glicerol quinasa diluida) a cada cubeta, agitamos de nuevo por inversión. Incubamos a temperatura ambiente 30 minutos y volvemos a medir la absorbancia a 340nm (DO2).

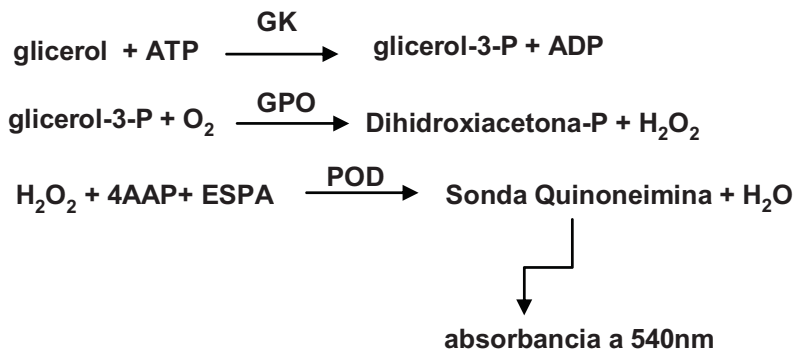
13. Para calcular la concentración de glicerol liberado, primero calculamos el incremento de absorbancia de cada muestra y de cada patrón,  $\Delta DO = (DO2 - DO1)$

14. Con los valores de  $\Delta DO$  y concentración de los patrones construimos una recta patrón mediante la cual calculamos los nmoles de glicerol de cada muestra a partir de su  $\Delta DO$  (este valor lo multiplicamos por 4, ya que medimos 250 $\mu$ l del medio total por pozo (1ml), para calcular los nmoles de glicerol liberados por pozo)

15. Como en el ensayo del transporte de glucosa, también valoramos la concentración de proteína para saber la cantidad total de proteína en cada pozo y poder después expresar la tasa de lipólisis en nmoles de glicerol/mg de proteína. Se valoró la cantidad de proteínas de 20 $\mu$ l de los homogenados de cada pozo por el método de Pierce.

#### 5.4.2 Determinación de la cantidad de glicerol liberado mediante el método colorimétrico del Kit "Free Glycerol Reagent" de Sigma.

Este kit contiene los enzimas y reactivos necesarios para llevar a cabo las reacciones:



#### Materiales y reactivos:

- "Free Glycerol Reagent" (Sigma F6428): Se reconstituye en 40ml de agua, y se mantiene 2 meses estable a 4°C tras su reconstitución. Es importante mantenerlo siempre protegido de la luz.

- Patrón: 1ml de cada una de las concentraciones 0, 0,3mM, 0,6mM, 1,2mM, 2,4mM y 4,8mM de glicerol (diluidas con agua bidestilada a partir del glicerol 10mM)

- Insulina 10  $\mu$ M: 8  $\mu$ l de Insulina (5mg/ml) en 700  $\mu$ l KRHB

- Adrenalina: stock 10mM en HCl 50mM. El día del experimento la diluyo 100.000 veces en tampón KRHB (en dos diluciones 1/100 consecutivas, quedando a 100nM), y de esta solución diluyo directamente en el pozo 100 veces, 10 $\mu$ l en 1ml, quedando a una concentración de 1nM.

- Isoproterenol 1mM, a partir del cual diluimos 100 veces directamente en el pocillo cuando realizamos el experimento (10 $\mu$ l en 1ml) quedando a una concentración final de 10 $\mu$ M

- IBMX 100mM (ver apartado 1.3.3), que diluimos 200 veces en el experimento para que nos quede a una concentración final en el pozo de 0,5mM.

#### Procedimiento:

El protocolo es similar al explicado en el apartado anterior (5.4.1). Brevemente:

1. Ayuno de las células crecidas también en placas *6well* durante 2 horas
2. Cambiamos el medio por medio de ayuno fresco donde añadimos la insulina, la adrenalina, y/o el isoproterenol e IBMX a las concentraciones deseadas.
3. Tras 30 minutos (o 1 hora según el experimento), recogemos los medios y los llevamos a viales eppendorf.
4. Tomamos 10 $\mu$ l de cada una de las soluciones patrón y 20 $\mu$ l de las muestras, y las colocamos en los pozos de una placa de 96 pozos (*96well*) por duplicado.
5. Añadimos 200 $\mu$ l del reactivo "Free Glycerol Reagent" a cada pocillo de la placa *96well*, incubamos 5-10minutos a temperatura ambiente.
6. Valoramos la absorbancia a 540nm en un espectrofotómetro de los patrones y de las muestras, y realizamos el mismo tipo de cálculos que el apartado 5.4.1.

## 5.5 Medida del transporte de ácidos grasos de cadena larga (LCFA)

#### Materiales y reactivos:

- **<sup>14</sup>C<sub>1</sub>-Ácido Palmítico** (code: CFA23)(250  $\mu$ Ci/1.25 ml, es decir, 0.2  $\mu$ Ci/ $\mu$ l) (1mCi son aprox.  $2.2 \times 10^6$  dpm). Añadiremos 4 $\mu$ Ci/ $\mu$ mol de ácido palmítico añadido a las células.

- **BSA** (sin ácidos grasos, sigma A6003)

- **Stock Ácido Palmítico frío 100mM** esterificado con NaOH en una proporción 1.2 moles de NaOH : 1 mol ácido palmítico. Para prepararlo mezclamos:

• 27.5 mg de ácido palmítico (Mw 256,4). en 1.07 ml H<sub>2</sub>O = 0.107 mmoles ácido palmítico.

• Añadimos 0.128 mmoles NaOH, es decir, 64  $\mu$ l de una solución 2M

Dejamos que se disuelva en *thermoblock* a 70°C en agitación suave (ojo!! No invertir el tubo). Se guarda congelado a -20°C.

- **Solución radiactiva de transporte.** Consiste en medio DMEM de ayuno (apartado 1.3.6) al que no le hemos añadido BSA

• El transporte lo realizamos a una concentración de ácido palmítico 100 $\mu$ M, es decir 100nmoles/ml. Por tanto añadiremos 1 $\mu$ l de la solución stock de ácido palmítico frío 100mM por cada ml de solución radiactiva de transporte que preparemos.

• <sup>14</sup>C<sub>1</sub>-Acido Palmítico (0.2  $\mu$ Ci/ $\mu$ l): Necesitamos 4  $\mu$ Ci/ $\mu$ mol de ácido palmítico, por tanto, añadiremos 0,4 $\mu$ Ci por ml de solución radiactiva de transporte, es decir, 2 $\mu$ l de la solución stock <sup>14</sup>C<sub>1</sub>-Acido Palmítico (0.2  $\mu$ Ci/ $\mu$ l)

• BSA (Mw 60.000): la relación ácido palmítico : BSA es 2,5 : 1. Por tanto, en 1ml de medio de solución radiactiva de transporte tengo que añadir 40nmoles (2,4mg) de BSA.

Para preparar la solución radiactiva de transporte calcularemos el volumen total que necesitamos, 1ml/pozo de placa *6well*, por ejemplo 30ml para 4 placas:

En primer lugar descongelamos el ácido palmítico frío 100mM en un *thermoblock* a 70°C.

En segundo lugar, tomamos el volumen necesario de  $^{14}\text{C}_1$ -Acido Palmítico (60 $\mu\text{l}$  en nuestro ejemplo), lo pasamos a un tubo eppendorf y evaporamos el solvente orgánico (tolueno normalmente) en que viene disuelto mediante la aplicación de  $\text{N}_2$  en la campana de extracción de gases.

Una vez evaporado, colocamos el eppendorf en el *thermoblock* a 70°C también, y le añadimos el volumen indicado (30 $\mu\text{l}$  en nuestro ejemplo) de la solución de ácido palmítico frío 100mM. Dejamos el tubo a 70°C

Calentamos en un tubo de 50ml el volumen de medio de ayuno necesario (30ml) donde previamente hemos disuelto BSA (72mg) a 42°C en un baño, y añadimos la mezcla de ácido palmítico frío y marcado radiactivamente al tubo de 50ml, observando que no solidifique el ácido palmítico. Este paso se ha de hacer rápido y es importante que ambas soluciones estén a la temperatura descrita.

Una vez mezclado, dejamos incubando la solución durante 30 minutos a 37°C

- **Solución de lisis:**

NaOH 0,1N

SDS 0,1%

- **Insulina 10  $\mu\text{M}$ :** 8  $\mu\text{l}$  de Insulina (5mg/ml) en 700  $\mu\text{l}$  KRHB

- **Phloretina** (Calbioquem nº catálogo 524488)

- **Solución STOP fría:** PBS con albúmina (BSA) a una concentración 0,5% (w/v) y phloretina 200 $\mu\text{M}$

#### Procedimiento:

1. Ayuno de las células: Lavamos las células tres veces con PBS para eliminar los restos de suero. A continuación, incubamos las células durante 2 horas con medio de ayuno (ver apartado 1.3.6) (2ml/pozo placa *6well*)

2. Añadimos la insulina (10 $\mu\text{l}$  de la solución 10 $\mu\text{M}$ ) que quedará a una concentración final de 100nM, e incubamos durante 30 minutos

3. COMIENZA EL TRANSPORTE: Añadimos 1ml de la solución radiactiva de transporte a cada pozo de la placa *6well*. A los 2 minutos se para el transporte añadiendo 5 ml/pozo de tampón STOP a 4°C, y dejando las células a 4°C.

4. Una vez se ha parado el transporte en todos los pozos, se realizan 3 lavados con tampón STOP para eliminar toda la radiactividad no incorporada a las células. Después del último lavado aspiramos bien el tampón y añadimos a cada pozo 800 $\mu\text{l}$  de tampón de lisis. Dejamos las placas agitando a temperatura ambiente durante 1 hora y después homogeneizamos los lisados pipeteando con una pipeta P-1000.

5. CONTAJE RADIATIVO: Dos fracciones de 250 $\mu\text{l}$  del homogenado celular se ponen en microviales de centelleo, se le añade 3ml de líquido de centelleo EcoLite y contamos la radiactividad incorporada a las células mediante un contador de partículas  $\beta$ .

Para medir la cantidad de radiactividad que aparece en las células de manera inespecífica, reservamos unos pozos donde añadimos la solución radiactiva después de haber añadido los 5ml del tampón STOP.

Para evaluar la cantidad de radiactividad total presente en cada pozo en el momento de la incubación, se pone directamente 1ml de solución radiactiva en dos microviales de centelleo, son las llamadas cuentas totales.

6. Con la finalidad de saber la cantidad total de proteína en cada pozo y poder después expresar la tasa de transporte en nmoles ácido palmítico/mg de proteína, se valora la cantidad de proteínas de 20 $\mu$ l de los homogenados de cada pozo por el método de Pierce.

7. Cálculos

$$\frac{\text{dpm vial} \times 800 \mu\text{l (volumen total)} \times 100 \text{ nmoles ac.palmítico} \times 1000(\text{para referirlo a mg proteína})}{\text{DPM total} \times 250 \mu\text{l (volumen medido)} \times n (\mu\text{g proteína en } 20 \mu\text{l}) \times 40 (\text{factor corrección})}$$

## 5.6 Medida de la salida de ácidos grasos al medio extracelular

Materiales y reactivos:

- **<sup>14</sup>C<sub>1</sub>-Ácido Oleico** (code: CFA243) (100 $\mu$ Ci/ml, es decir, 0.1  $\mu$ Ci/ $\mu$ l) (1mCi son aprox.  $2.2 \times 10^6$  dpm). Añadiremos 4 $\mu$ Ci/ $\mu$ mol de ácido oleico añadido a las células.

- **BSA** (fatty acid free, sigma A6003)

- **Stock ácido oleico frío 100mM** esterificado con NaOH en una proporción 1.2 moles de NaOH : 1 mol ácido oleico. Para prepararlo mezclamos:

• 28,45 mg de ácido oleico (Mw 284.5). en 1 ml de H<sub>2</sub>O = 0.1mmoles ácido oleico.

• Añadimos 0.128 mmoles NaOH, es decir, 60  $\mu$ l de una solución 2M

Dejamos que se disuelva en *thermoblock* a 70°C en agitación suave (ojo!! No invertir el tubo). Se guarda congelado a -20°C

- **Solución radiactiva de incubación:** Consiste en medio DMEM de ayuno (1.3.6) al que no le hemos añadido todavía BSA.

• La incubación la haremos con ácido oleico 50 $\mu$ M, es decir, 50nmoles/ml. Por tanto añadiremos 0,5 $\mu$ l de la solución stock de ácido oleico frío 100mM por cada ml de solución radiactiva de incubación que preparemos.

• **<sup>14</sup>C<sub>1</sub>-Acido Oleico** (0.1  $\mu$ Ci/ $\mu$ l): Necesitamos 4  $\mu$ Ci/ $\mu$ mol de ácido oleico, por tanto, añadiremos 0,2 $\mu$ Ci por ml de solución radiactiva de transporte, es decir, 2 $\mu$ l de la solución stock **<sup>14</sup>C<sub>1</sub>-Ácido Oleico** (0.1  $\mu$ Ci/ $\mu$ l)

• **BSA** (Mw 60.000): la relación ácido oleico : BSA es 2,5 : 1. Por tanto, en 1ml de medio de solución radiactiva de transporte tengo que añadir 20nmoles (1,2mg) de BSA.

Para preparar la solución radiactiva de incubación calcularemos el volumen total que necesitamos, 1ml/pozo de placa *6well*, por ejemplo 30ml para 4 placas, y procedemos igual que para preparar la solución radiactiva de transporte del apartado anterior (5.5). Aunque en este caso, el medio de ayuno después de añadirle el BSA, es filtrado a través de filtros de 0,2  $\mu$ m.

- **Isoproterenol 1mM**, a partir del cual diluimos 100 veces directamente en el pocillo cuando realizamos el experimento (10 $\mu$ l en 1ml) quedando a una concentración final de 10 $\mu$ M

- **IBMX 100mM** (ver apartado 1.3.3), que diluimos 200 veces en el experimento para que nos quede a una concentración final en el pozo de 0,5mM.

- **Solución de lisis:**

NaOH 0,1N

SDS 0,1%

Procedimiento:

1. Ayuno de las células: Lavamos las células tres veces con PBS para eliminar los restos de suero. A continuación, incubamos las células durante 2 horas con medio de ayuno (ver apartado 1.3.6) (2ml/pozo placa 6well)

2. Añadimos 1ml de la solución radiactiva de incubación a cada pozo de la placa 6well, y dejamos las placas incubando toda la noche en un incubador a 37°C, 95% de humedad y 10% CO<sub>2</sub>

3. Tras 16 horas de incubación, recogemos dos volúmenes de 250µl de cada pozo, los ponemos en microviales de centelleo, añadimos 3ml de líquido de centelleo EcoLite y contamos la radiactividad que queda en los medios mediante un contador de partículas β. (serán las dpm del medio o/n)

4. Entonces se realizan 3 lavados con tampón PBS-0,5%BSA para eliminar toda la radiactividad no incorporada a las células. Reservamos 1/3 de los pozos, donde añadiremos ya, 800µl de solución de lisis (estos pozos nos indicarán la radiactividad incorporada a las células tras la incubación)

5. Al resto de los pozos, les añadimos medio de ayuno con o sin Isoproterenol e IBMX (1/3 de los pozos para cada condición). Los incubamos 30 minutos a 37°C.

6. Posteriormente de nuevo, recogemos los medios como en el punto 3, para contar su radiactividad, que indicará la cantidad de radiactividad (ácidos grasos) que salen al medio procedente de las células tras 30 minutos, en condición basal o estimulada.

7. Lavamos dos veces estos pozos con tampón PBS-0,5%BSA, y añadimos a cada pozo 800µl de tampón de lisis. Dejamos las placas agitando a temperatura ambiente durante 1 hora y después homogeneizamos los lisados pipeteando con una pipeta P-1000.

8. Procedemos al conteo de la radiactividad incorporada a las células de la misma manera que el punto 5 del apartado anterior (5.5)

Dos fracciones de 250µl del homogenado celular se ponen en microviales de centelleo, se le añade 3ml de líquido de centelleo EcoLite y contamos la radiactividad incorporada a las células mediante un contador de partículas β.

Para evaluar la cantidad de radiactividad total presente en cada pozo en el momento de la incubación, se pone directamente 1ml de solución radiactiva en dos microviales de centelleo, son las llamadas cuentas totales.

Con la finalidad de saber la cantidad total de proteína en cada pozo, se valora la cantidad de proteínas de 20µl de los homogenados de cada pozo por el método de Pierce.

9. La cantidad de ácidos grasos que salen al medio extracelular se expresa como las dpm (descomposiciones radiactivas por minuto) que aparecen en el medio, normalizadas por la radiactividad total (dpm de las células + dpm del medio).

## 5.7 Ensayos de internalización de la toxina colérica marcada con el fluorocromo (CTB-FITC)

### Materiales y reactivos:

- Cadena B de la toxina colérica conjugada al fluorocromo FITC (CTB-FITC)(Sigma C-1 655)
- Cadena B de la toxina colérica (Sigma C-9903)
- Medio de ayuno (apartado 1.3.6)
- Paraformaldehido 3%
- PBS



Procedimiento: (según lo publicado por (Henley *et al.*, 1998)

1. El protocolo se realiza a partir de adipocitos 3T3L1 crecidos y diferenciados en cubreobjetos de 10mm de diámetro. Previamente a comenzar el experimento, colocaremos cada cubreobjetos en un pozo de una placa de 24 pozos (*24well*).

2. Los adipocitos se incuban durante dos horas en medio de ayuno. Posteriormente, si queremos estudiar el efecto de algún tratamiento, este es el momento donde deberíamos iniciar su incubación a la concentración y tiempo indicado.

3. Colocamos la placa de 24 pozos sobre una superficie plana a 4°C e incubamos las células durante 30 minutos añadiendo 500µl/pozo de medio de ayuno que contiene 4µg/ml de CTB-FITC. Durante este periodo, la cadena B de la toxina colérica se une al receptor de gangliósidos GM1.

4. Lavamos las células tres veces con medio de ayuno a 4°C para eliminar toda la toxina colérica que no se haya unido a la membrana plasmática.

5. En este punto, una parte de los cubreobjetos los fijamos con paraformaldehido 3% para analizar la cantidad de toxina colérica que ha quedado unida a la membrana plasmática, y que será, por tanto, el punto de partida de los experimentos de internalización.

6. El resto de cubreobjetos se incuban con medio de ayuno sin CTB-FITC a 37°C durante una hora. Durante este periodo, se produce la internalización de la toxina colérica al interior celular.

7. Fijamos los cubreobjetos con paraformaldehido 3% durante 30 minutos y ya podemos proceder al montaje de los cubreobjetos sobre los portaobjetos usando el medio de montaje Mowiol tal y como se indica en el punto 13 del apartado 4.3 de esta sección.

8. Pasadas 12 horas ya podemos proceder a la observación de las muestras en el microscopio óptico confocal.

En todos los experimentos, una pequeña parte de los cubres se reservan para analizar la unión inespecífica de la toxina colérica. Para ello, durante la incubación a 4°C se usa una mezcla de CTB-FITC (4µg/ml) y CTB sin marcar a una concentración 250 veces la de la CTB-FITC (1mg/ml)

## **5.8 Ensayo de translocación e internalización de GLUT4 a y desde la membrana plasmática.**

Materiales y reactivos:

- Medio de ayuno (apartado 1.3.6 de esta sección)
- Insulina 100nM en medio de ayuno.
- Krebs-Ringer-MES pH6. (apartado 5.2 de esta sección)
- Soluciones para la inmunolocalización de proteínas (apartado 4.3 de esta sección)
- Paraformaldehido 3%

Procedimiento:

1. El protocolo se realiza a partir de adipocitos 3T3L1 crecidos y diferenciados en cubreobjetos de 10mm de diámetro. Previamente a comenzar el experimento, colocaremos cada cubreobjetos en un pozo de una placa de 24 pozos (*24well*).

2. Los adipocitos se incuban durante dos horas en medio de ayuno.

3. Una parte de los cubreobjetos (1/3) se usan directamente para generar fragmentos de membrana plasmática de los adipocitos en estado basal siguiendo el protocolo 4.1 de esta sección.. En el resto, estimulamos la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática

cambiando el medio de ayuno, por otro fresco que contiene insulina 100nM, e incubando las células durante 30 minutos a 37°C.

4. Pasado este tiempo, otra parte de los cubreobjetos (1/3) se usa, como en el punto anterior, para generar fragmentos de membrana plasmática de los adipocitos en estado estimulado por insulina (apartado 4.1 de esta sección).

5. El resto de cubreobjetos se lavan tres veces con 2ml de tampón Krebs-Ringer-MES pH6, para separar la insulina de su receptor. Posteriormente las células se incuban durante 15 minutos con el tampón Krebs-Ringer-MES-0,2% BSA pH6 a 37°C. Durante este tiempo el transportador de glucosa GLUT4 se internaliza.

6. Finalmente, como antes, obtenemos fragmentos de membrana plasmática de estos adipocitos donde ha ocurrido parte de la internalización de GLUT4, siguiendo el protocolo 4.1 de esta sección.

7. A partir de este momento llevamos a cabo una inmunolocalización de GLUT4 sobre fragmentos de membrana plasmática siguiendo el protocolo 5.3 de esta sección.

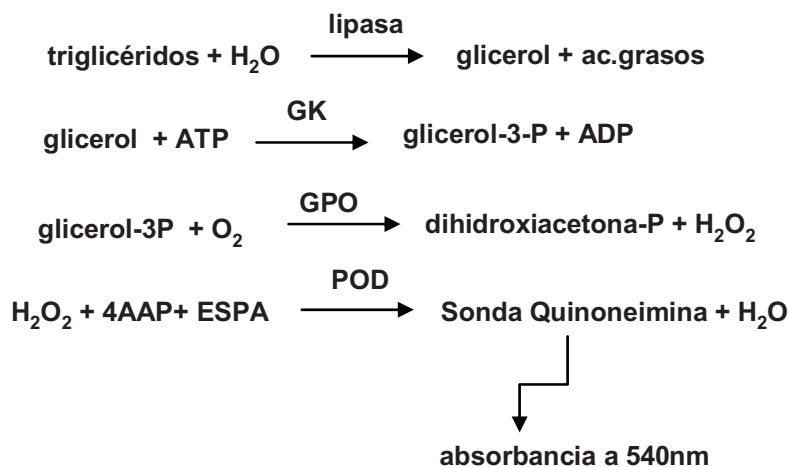
8. La observación de las muestras se ha realizado en un microscopio de fluorescencia confocal Leica TCS 4D láser, con un objetivo de 63 aumentos en el "Servicio de Microscopía Confocal" de los "Servicios Científicotécnicos" de la Universidad de Barcelona.

La cuantificación de la intensidad de fluorescencia en las imágenes captadas de los fragmentos de membrana plasmática, se hizo usando el *software* de cuantificación que posee el ordenador con el que se manipula el microscopio Leica TCS 4D láser.

## 5.9 Determinación de triglicéridos en homogenados de adipocitos 3T3L1

Para determinar los triglicéridos en homogenados celulares de adipocitos 3T3L1 se usó el kit comercial de BioSystems "*enzymatic-espectrofotometric Glicerol Fosfat Oxidasa/Peroxidasa*".

Los reactivos presentes en este Kit, permiten que se lleven a cabo una serie de reacciones a partir de los triglicéridos presentes en las muestras, de tal forma que dan lugar a un reactivo (quinonaimina) que puede cuantificarse por su absorbancia a 550nm mediante un espectrofotómetro.



Materiales y reactivos:

- Reactivos del Kit “enzymatic-espectrofotometric Glicerol Fosfat Oxidasa/Peroxidasa” de ByoSystems (COD 11528)
- Patrón de triglicéridos: glicerol equivalente a trioleína 2,26mmoles/l (200mg/dl)
- Homogenados de adipocitos obtenidos tras la lisis con cualquiera de los tampones usados en los distintos protocolos de extracción de proteínas: TampónA-igepal1%, HES, RIPA, tampón de lisis (0,1N NaOH, 0,1 %SDS).

Procedimiento:

1. Dejamos que los reactivos se atemperen durante 2 minutos.
2. Tomamos 15 $\mu$ l de cada uno de los homogenados de adipocitos (obtenidos al añadir 800 $\mu$ l de tampón de lisis a un pozo de una placa 6well) ,5 $\mu$ l de la solución patrón + 10 $\mu$ l de tampón de lisis(11,3nmoles trioleína) y 15 $\mu$ l de tampón de lisis (blanco), y los colocamos en los pozos de una placa 96well por triplicado.
3. Añadimos 200 $\mu$ l del reactivo del kit a cada pocillo de la placa 96well, incubamos 5-10minutos a 37°C
6. Valoramos la absorbancia a 540nm en un espectrofotómetro de las muestras, el patrón y el blanco calculamos las absorbancias como.  $\Delta Abs_{muestra} = Abs\ muestra - Abs\ blanco$  y  $\Delta Abs_{patrón} = Abs\ patrón - Abs\ blanco$ .

Con la finalidad de saber la cantidad total de proteína en cada pozo y poder después expresar los nmoles de triglicéridos/mg de proteína, se valora la cantidad de proteínas de 20 $\mu$ l de los homogenados de cada pozo por el método de Pierce.

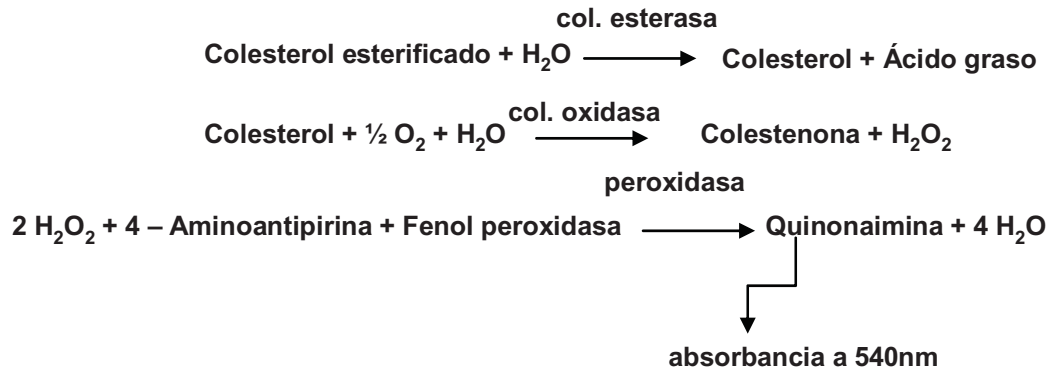
Realizamos el siguiente cálculo para calcular los nmoles de triglicéridos/ml

$$\frac{\Delta Abs_{muestra} \times 11,3 \text{ nmoles triglicéridos} \times \text{Volumen total lisado} (800\mu\text{l}) \times 1000 (\text{para referirlo a mg prot})}{\Delta Abs_{patrón} \times \text{volumen medido} (15\mu\text{l}) \times n(\mu\text{g proteína en } 20\mu\text{l}) \times 40 (\text{factor corrección de volumen})}$$

## **5.10 Determinación del colesterol total en homogenados de adipocitos 3T3L1**

Para determinar la cantidad de colesterol total en los homogenados de adipocitos 3T3L1 se usó el kit de ByoSystems “colesterol oxidasa/peroxidasa” (COD 11805)

Tanto el colesterol libre como el esterificado presentes en la muestra originan, según las reacciones acopladas descritas a continuación, un complejo coloreado que se cuantifica por espectrofotometría.

Materiales y reactivos:

- Reactivos del Kit "colesterol oxidasa/peroxidasa" de ByoSystems (COD 11805)
- Patrón de colesterol: 5,18 mmoles/l (200mg/dl)
- Homogenados de adipocitos obtenidos tras la lisis con cualquiera de los tampones usados en los distintos protocolos de extracción de proteínas: Tampón A-igepal1%, HES, RIPA, tampón de lisis (0,1N NaOH, 0,1 %SDS).

Procedimiento:

Es idéntico al explicado para la determinación de triglicéridos en homogenados de adipocitos en el apartado anterior, 5.9

En este caso los cálculos se realizarán aplicando la fórmula:

$$\frac{\Delta \text{Abs}_{\text{muestra}} \times 25,9 \text{nmoles colesterol} \times \text{Volumen total lisado} (800 \mu\text{l}) \times 1000 (\text{para referirlo a mg prot})}{\Delta \text{Abs}_{\text{patrón}} \times \text{volumen medido} (15 \mu\text{l}) \times n (\mu\text{g proteína en } 20 \mu\text{l}) \times 40 (\text{factor corrección de volumen})}$$

### 5.11 Medida de la actividad lipasa en homogenados de adipocitos 3T3L1

Para valorar la actividad lipasa se usó un protocolo de la doctora Julia Peinado de la Universidad de Barcelona modificado de (Ramirez et al., 1985). El método cuantifica la actividad enzimática gracias a la radiactividad del producto de la reacción. Como sustrato radiactivo se usa la trioleína marcada con  $^3\text{H}$ . Los ácidos grasos libres, producto del proceso catalítico, se separan en triacilgliceroles no hidrolizados por un sistema de repartición líquido-líquido que a la vez sirve para parar la reacción. Finalmente, la radiactividad se cuantifica utilizando un líquido de centelleo que emite fotones en cantidades proporcionales a las desintegraciones radiactivas de la sustancia que se analiza.

Materiales y reactivos:

- Tampón de valoración pH7,5
  - PIPES (Sigma) 25.mM
  - MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O (Panreac) 55 mM
  - Albúmina bovina (*fatty acid free*) (Sigma) 0,05 % p/v (7.6 μM)
  - Sulfato de protamina(Sigma) 10 mg/ml
  - Cloruro sódico 1 M

Se conserva alicuotado y a -20°C

- Tampón EDH (sin heparina) pH7,5
  - DTT (Sigma) 1 mM
  - EDTA (Panreac) 1 mM
  - HEPES (Roche Diagnostics) 10 mM

Se conserva alicuotado y congelado a -20°C

- Stock de sustrato trioleína (TO<sup>\*</sup>)
  - Trioleína fría (Sigma) 250 mg
  - Trioleína radioactiva (Amersham) 5 mCi/mL 0.6 ml

Se diluyen en un volumen total de 8 ml con tolueno (Fluka)

La actividad específica final del stock es de 7500 dpm/nmol oleato. Se conserva a -20°C.

- Solución STOP: Metanol/cloroformo/heptano (1,45 : 1,21 : 1)(v:v:v). Se guarda a 4°C

- Tampón borato-carbonato pH10,5
  - H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (Merk) 0.1 M
  - K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Sigma) 0.1 M

Se guarda a 4°C.

- Líquido de centelleo EcoLite (ICN)

Procedimiento:

1. Calculamos la cantidad necesaria de stock de sustrato trioleína y de tampón de valoración, en función del número de tubos. En general, para cada tubo se utilizan:

- 1,2 μl de stock TO<sup>\*</sup>
- 60 μl de tampón de valoración

El volumen de stock TO<sup>\*</sup> (previamente atemperado) lo pasamos a un tubo de 15ml e vidrio pyrex (dentro de una campana de extracción de gases) y evaporamos el solvente (tolueno) mediante la aplicación de N<sub>2</sub>

2. Sonicación de la solución: Una vez evaporado el tolueno añadimos el volumen calculado tampón de valoración (no más de 3ml por tubo) y se sonica con 4 pulsos de 30 segundos con intervalos de 15 segundos a 4°C. (sonicador Labsonic, Braun) (si añadimos más volumen de tampón de valoración sonicaremos 30" más por cada 2ml). Dejamos el tubo en hielo.

3. Se preparan los homogenados celulares añadiendo 500μl de solución EDH por placa de 10cm Ø, y se lisan también por sonicación (3 pulsos de 30" con intervalos de 10"). Se mantienen siempre en hielo.

4. Tomamos 7μl de las muestras sin diluir y diluidas 1/2 por duplicado, y las ponemos en tubos de vidrio (Corning).

En cada valoración, además preparamos 4 blancos (7 $\mu$ l de tampón EDH) como índice de la hidrólisis espontánea de la TO\*, y dos controles positivos ( 7 $\mu$ l de patrones de hígado y corazón diluidos 1/4 con tampón EDH por duplicado)

5. A continuación se añaden 60 $\mu$ l de la solución que contiene el sustrato radiactivo a cada muestra, se agita mediante vórtex y se incuban en un baño a 25°C durante 30 minutos exactos.

6. La reacción se para añadiendo a cada tubo 1,2 ml de solución STOP, después se añade 330 $\mu$ l del tampón borato-carbonato, agitamos fuertemente con vórtex hasta que se inviertan las fases de los disolventes añadidos.

7. Los tubos se centrifugan a 1000g (Jouan CR312) a 4°C durante 10 minutos. Se forman así dos fases, una inferior más turbia que contiene el cloroformo y el heptano, que mantiene disueltos los triacilgliceroles no hidrolizados, y otra superior transparente, que contiene metanol, agua y sales, donde está el oleato originado durante el proceso enzimático.

8. Pasamos 300 $\mu$ l de la fase superior a viales de centelleo con 4ml de líquido de centelleo, y medimos la radiactividad mediante un contador de partículas beta que muestra las desintegraciones radiactivas por minuto (dpm)

Además para determinar las cuentas totales (CT), añadimos 25 $\mu$ l del sustrato radiactivo a 4 viales para medir también su radiactividad.

9. Para los cálculos, expresaremos los resultados en actividad por millón de células. En las lipasas, se define como unidad de actividad enzimática (U) la cantidad de enzima que libera 1 $\mu$ mol de producto por minuto a 25°C. Así tendremos en cuenta:

Las dpm obtenidas (que restamos de las dpm de los blancos).El Volumen de muestra (Vm= 0,5ml), la disolución de la muestra (D=1 o 2), el volumen del homogenado que se valora (Vd=0,007ml). El volumen contado de la fase superior (aFS= 0,3ml), y el volumen total (VtFS=0,859ml). El tiempo de reacción (T= 30minutos). La actividad específica del stock (AE= 7535dpm/nmoles de oleato) a partir de las cuentas totales.

$$\frac{\text{Dpm} \times \text{D} \times \text{VtFs} \times \text{Vm}}{\text{aFS} \times \text{Vd} \times \text{mill. de células} \times \text{T} \times \text{AE}}$$

## 6 Técnicas relacionadas con la obtención de proteínas

### 6.1 Obtención de proteínas totales de células en cultivo

Como veremos en este apartado (6), y como se describe en varios manuales como "Currents Protocol in Protein Science" (Coligan et al.,2001) existen numerosos protocolos para obtener las proteínas de un extracto celular. El objetivo para obtener los extractos celulares totales es lisar las células. Este paso de lisis puede conseguirse mediante el uso de detergentes, mediante choque osmótico o por rotura mecánica. Es importante que el tampón usado durante la lisis celular tenga un rango de sales y pH fisiológicos de tal manera que no desnaturalicemos prematuramente las proteínas.

La lisis basada en detergentes es la más ampliamente usada. El objetivo es permeabilizar las membranas celulares (tanto la plasmática como las de los orgánulos) para favorecer la salida del contenido celular y provocar finalmente su lisis. Sin embargo, los detergentes se han de usar con cuidado para no alterar interacciones entre proteínas o

características estructurales. Existen varios tipos de detergentes más o menos potentes, que se utilizan según el tipo celular y las proteínas en estudio. Normalmente los detergentes se separan en dos grupos; iónicos y no iónicos, según sus propiedades químicas. El grupo de detergentes no iónicos (como Igepal, Tritón-X-100 o Tween-20) se considera más “suave” que el grupo de detergentes iónicos (SDS, DOC). Tanto los tampones como los procedimientos usados durante la lisis se han de adaptar a cada tipo celular en cada tipo de experimento.

El método general para la obtención de muestras de proteínas a partir de células HeLa y de preadipocitos y adipocitos 3T3L1 (además de los protocolos específicos explicados en este apartado, 6) para analizarlas posteriormente por SDS-PAGE y western blot es el que se describe a continuación:

### Materiales y reactivos:

- Tampón A pH 7,4
  - HEPES 50mM
  - EDTA 10mM
  - NaCl 150mM
  - Inhibidores de fosfatasas:  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  10mM  
NaF 100mM  
Ortovanadato 1mM
- Tampón de lisis: Tampón A-Igepal 1%- Inhibidores de proteasas
  - Tampón A
  - Igepal (NP40) 1% (v/v)
  - Inhibidores de proteasas. Normalmente añadimos una pastilla de C-complete (Roche) por 10ml de tampón de lisis (ver apartado 6.2 de esta sección)
- PBS

### Procedimiento:

1. Colocamos las células crecidas en placa de 10cm Ø (para otros soportes se escalan los volúmenes indicados según la superficie) en hielo y las lavamos dos veces con PBS frío y una vez con tampón A.
2. Añadimos 500µl de tampón de lisis por placa de 10cm Ø, las recogemos con ayuda de un *scraper* y las pasamos a tubos eppendorf en hielo.
3. Homogeneizamos la muestra pasándola por una jeringa de 25G 10 veces.
4. Dejamos que se complete la homogenización de la muestra, dejando los tubos en agitación a 4°C durante 30 minutos-1hora.
5. Centrifugamos los eppendorf durante 30minutos a 4°C a máxima velocidad en una centrífuga de mesa.
6. Recogemos el sobrenadante que contiene las proteínas solubilizadas (en el caso de adipocitos descartamos la fase de lípidos que queda en la parte superior del tubo) en otro tubo limpio y descartamos la fracción no solubilizada que está en el *pellet*.
7. Valoramos la cantidad de proteínas mediante el método de Pierce (apartado 7.1.2), alicuotamos la muestra, y congelamos a -80°C hasta su uso.

## 6.2 Fraccionamiento subcelular de adipocitos 3T3L1

### Materiales y reactivos:

<b>- Tampón HES pH 7.4</b>	500 ml
Hepes 20mM	8 ml (de 1.25 M)
EDTA 1mM	2.5 ml ( de 200mM)
Sacarosa 255mM	43.64 g (Pm 342.30)

### **- Tampón de lisis HES + inhibidores de proteasas.**

A un pequeño volumen del tampón HES (10ml por cada 10 placas de 10cm Ø que preparemos) le añadiremos los Inhibidores de proteasas justo antes de comenzar la lisis celular:

- El método más usado el cóctel inhibitor de proteasas “C-complete” de Roche. Se usa una pastilla por cada 10ml de tampón de lisis
- Alternativamente se usa una mezcla de inhibidores preparados a partir de las soluciones stock:
 

PMSF	0,5mM	(stock 50 mM (100x) a -20°C)
Aprotinina	2µg/ml	(stock 100x a 4°C)
Pepstatina	2µM	(stock 2mM (1000x) a -20°C)
Leupeptina	2µM	(stock 2mM (1000x) a -20°C)

<b>- Cojín de sacarosa</b>	100 ml
HEPES 20mM	1.6 ml (de 1.25 M)
Sacarosa 1,12 M	38.33 g
<b>- HEPES 20 mM</b>	

### Procedimiento:

1. Partimos de adipocitos crecidos y diferenciados en placas de 10cm Ø. Son necesarias al menos dos placas por cada condición.
2. Incubamos las células durante dos horas con medio de ayuno (apartado 1.3.6 de esta sección).
3. Posteriormente, si es el caso, se incuban las células en presencia de los tratamientos, efectores deseados durante el tiempo indicado. Para observar la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática (figura 39 de la sección resultados) las células se incuban con insulina 100nM en medio de ayuno durante 30minutos,
4. Ponemos las placas en hielo y las lavamos dos veces con 4 ml de tampón HES enfriado en hielo.
5. Añadimos 4ml de tampón de lisis HES con inhibidores de proteasas a las placas (se lo añadimos a una de las placas y la misma solución es la que uso para lisar todas las placas de la misma condición), recogemos las células con ayuda de un *scraper* y pasamos el contenido al interior de un homogeneizador Potter enfriado en hielo. El volumen final no debe sobrepasar los 12ml.
6. Lisamos y homogeneizamos la muestra con un émbolo de teflón, realizando 10 subidas y bajadas a 1500rpm (la distancia del émbolo al homogeneizador de vidrio es 0,13-0,18mm).
7. Recogemos el homogenado en tubos de Nalgene de 30ml y centrifugamos a 16000g en JA 25.50 durante 20 min. a 4°C (o también 10500rpm en sorvall SA600)



8. Descartamos la grasa sólida de la parte superior del tubo y recogemos:

Sobrenadante: LDM + HDM

*Pellet*: Membrana Plasmática + mitocondria + núcleos

9. SOBRENADANTE: Transferimos el sobrenadante a un tubo de ultracentrífuga de 10ml y centrifugamos a 44000g durante 20 min. a 4°C usando un rotor JA25.50.

- El *pellet* obtenido constituyen la fracción lo resuspendemos de nuevo en tampón de lisis HES + inhibidores de proteasas y lo volvemos a centrifugar a 44000g durante 20 min. a 4°C. El *pellet* constituirá la fracción de membranas de alta densidad (**HDM**) y las resuspendemos en 200µl de HEPES 20 mM.

- El sobrenadante lo pasamos a tubos de utracentrífuga de 10 ml y centrifugamos a 180.000 g durante 75 min. El *pellet* obtenido constituye la fracción de membranas de baja densidad (**LDM**) y resuspendemos en 300 µl de HEPES 20 mM.

10. El *pellet* de la primera centrifugación (membrana plasmática, mitocondrias y núcleos) se resuspende en 1 ml de HES + IP frío y lo depositamos sobre 8.2 ml del cojín de sacarosa 1,12M. Centrifugamos a 100.000 g durante 70 minutos (28.500 rpm) en el rotor SW41Ti.

11. La interfase con el cojín de sacarosa contiene las membranas plasmáticas. Recogemos esta interfase con ayuda de una pipeta *pasteur* de plástico y la pasamos a un tubo de nalgene de 30ml, añadido tampón de homogenización y hepes 20 mM en la misma proporción y centrifugamos a 16000 g durante 20 min. a 4°C (9960 rpm en rotor JA12). El pellet obtenido se resuspende en 100ml de HEPES 30mM y constituye la fracción de **membranas plasmáticas**.

12. El pellet resultante de esta última centrifugación constituye la fracción de mitocondrias y núcleos, y puede resuspenderse y volverse a centrifugar en las mismas condiciones para obtener esta fracción.

13. Las distintas fracciones se homogenizan por pipeteo fuerte y posterior sonicación a 4°C (3 pulsos de 10" con intervalos de 10").

14. Valoramos la cantidad de proteína recuperada en cada fracción por el método de Bradfor (Biorad). Fraccionamos las distintas muestras obtenidas en alícuotas y las congelamos a -80°C.

### 6.3 Obtención de membranas totales a partir de células.

#### Materiales y reactivos:

- <b>Tampón HES pH 7.4</b>	500 ml
Hepes 20mM	8 ml (de 1.25 M)
EDTA 1mM	2.5 ml ( de 200mM)
Sacarosa 255mM	43.64 g (Pm 342.30)

- **Tampón de lisis HES + inhibidores de proteasas.(IP)** Añadimos 1 pastilla del cóctel inhibidor de proteasas "C-complete" de Roche por cada 10ml de tampón de lisis

- **HEPES 20mM**

#### Procedimiento:

1. Es protocolo se realiza a partir de células crecidas en placas de 10cm Ø.
2. Ponemos las placas en hielo y las lavamos dos veces con 4ml de tampón HES a 4°C
3. Añadimos 1ml de tampón de lisis HES + IP a cada placa, recogemos las células con ayuda de un *scraper* y las ponemos en un tubo eppendorf en hielo.

4. Lisamos las células y homogeneizamos la solución mediante una jeringa de 1ml con una aguja de 25G, aspirando y expulsando la muestra al menos 10 veces.

5. Recogemos el homogenado en tubos eppendorf limpios y centrifugamos a 5000rpm (3000g) en una centrífuga de mesa durante 5 minutos a 4°C.

6. Descartamos la grasa sólida que queda en la parte superior del tubo. Recogemos el sobrenadante y lo transferimos a un tubo de ultracentrífuga de 1,5ml.

7. Centrifugamos a 200.000 g (55.000 rpm) en un rotor TLA55 durante 75 minutos a 4°C. El pellet obtenido se resuspende en 300µl de HEPES 20mM y constituye la fracción de membranas totales. Homogeneizamos bien la suspensión mediante pipeteo y posterior sonicación a 4°C (3 pulsos de 10" con intervalos de 10").

8. Valoramos la cantidad de proteína recuperada por el método de Bradford (Biorad). Fraccionamos las distintas muestras obtenidas en alícuotas y las congelamos a -80°C.

## 6.4 Aislamiento bioquímico de dominios *rafts* lipídicos/caveolas

### 6.4.1 Usando método de extracción con detergente Tritón-X-100 (Preparación de complejos de membrana insolubles en Tritón-X-100 (TICs))

#### Materiales y reactivos:

- Tampón de homogenización pH6:

- MES 25mM pH6
- NaCl 150mM
- Tritón-X-100 1% (v/v)
- Inhibidores de fosfatasas: Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 10mM  
NaF 100mM  
Ortovanadato 1mM

- Tampón de homogenización + inhibidores de proteasas (IP) Añadimos 1 pastilla del cóctel inhibidor de proteasas "C-complete" de Roche por cada 10ml de tampón de homogenización.

- Soluciones para preparar el gradiente de sacarosa:

• 80 % Sacarosa en H<sub>2</sub>O bidestilada: para preparar 50 ml (pesar 40 g de sacarosa en un vaso de precipitado y añadir H<sub>2</sub>O caliente hasta los 50 ml). Dejar agitando hasta que se disuelva.

• 35, 25, 15 y 5 % de sacarosa en tampón de homogenización sin Tritón ni inhibidores de proteasas.

- PBS

Procedimiento: En este protocolo es muy importante que todos los pasos se realicen en frío.

1. Partimos de adipocitos crecidos y diferenciados en placas de 10cm Ø (para un aislamiento óptimo suelen usarse 4-5 placas por condición)

2. Colocamos las placas en hielo, y las lavamos dos veces con 5ml de PBS frío y una vez con tampón de homogenización también frío. Aspiramos bien las placas.

3. Añadimos 500µl de tampón de homogenización sin Tritón-X-100 con inhibidores de proteasas a una placa de cada condición y recogemos las células con ayuda de un *scraper*, la suspensión obtenida la usamos para recoger las células de otra placa de la misma condición, y así sucesivamente. De esta manera no incrementamos mucho el volumen del lisado.

4. Una vez tenemos el volumen total del lisado en un tubo eppendorf, añadimos la cantidad necesaria de Tritón-X-100 para que quede a una concentración final del 1%.

5. Homogeneizamos las muestras pasándolas 10 veces por un homogenizador con émbolo de teflón a 1500rpm, y posteriormente pasamos la muestra 10 veces a través de una jeringa de 25G.

6. Recogemos el volumen (aproximadamente 1ml) del lisado y lo colocamos al fondo de un tubo de ultracentrífuga. Añadimos el mismo volumen de la solución de sacarosa al 80%. Lo mezclamos bien con ayuda de un vórtex. La concentración de sacarosa es ahora del 40%.

7. Con mucho cuidado y gota a gota, añadimos el mismo volumen (el resultado de restar 11ml, menos el volumen de solución al 40% que hay en el tubo y dividir este valor por 4) de las soluciones de sacarosa al 35%, 25%, 15% y 5% sucesivamente, encima de la capa que le precede, de tal manera que se vean las interfases entre las soluciones con distinta densidad (gradiente discontinuo)

8. Centrifugamos los gradientes durante 20 horas a 4°C a 39000 rpm (200.000g) en una ultracentrífuga usando el rotor SW41Ti.

9. Descargamos el gradiente desde la superficie, ml a ml, con mucho cuidado de no mezclar las diferentes fracciones, y las pasamos a tubos eppendorfs. El *pellet* lo resuspendemos en 500µl de tampón de homogenización con IP.

10. Normalmente la banda enriquecida en *rafts* lipídicos/caveolas se encuentra entre las densidades 15-25% de sacarosa (fracciones 4-5). Aunque para comprobar si el aislamiento se ha realizado correctamente se procede al análisis del mismo volumen (20µl) de cada fracción mediante SDS-PAGE y *western blot*.

11. Si queremos precipitar las proteínas de cada fracción para realizar otro tipo de experimentos, se diluye la fracción 2 o 3 veces añadiendo tampón de homogenización sin Tritón, y se centrifuga a 14000rpm 30 minutos. Los *pellets* obtenidos pueden fijarse con glutaraldehído 2,5% en PBS para ser procesadas posteriormente por microscopía electrónica y ver así la pureza del aislamiento.

#### 6.4.2 Usando método de extracción sin detergente con carbonato sódico a pH11

##### Materiales y reactivos:

- Tampón de homogenización pH11

- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 150mM
- EDTA 2mM
- Inhibidores de fosfatasas: Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 10mM
- NaF 100mM
- Ortovanadato 1mM

- Tampón de homogenización con inhibidores de proteasas (IP): Añadimos 1 pastilla del cóctel inhibitor de proteasas “C-complete” de Roche por cada 10ml de tampón de homogenización.

- Soluciones para preparar el gradiente de sacarosa

• 80 % Sacarosa en H<sub>2</sub>O bidestilada: para preparar 50 ml, pesar 40 g de sacarosa en un vaso de precipitado y añadir H<sub>2</sub>O caliente hasta los 50 ml. Dejar agitando hasta que se disuelva.

- 35, y 5 % de sacarosa en tampón MES 25mM pH6,5, NaCl 150mM y 2mM EDTA

- PBS

Procedimiento:

1. Partimos de adipocitos crecidos y diferenciados en placas de 10cm Ø (para un aislamiento óptimo suelen usarse 4-5 placas por condición)
2. Colocamos las placas en hielo, y las lavamos dos veces con 5ml de PBS frío y una vez con tampón de homogenización también frío. Aspiramos bien las placas.
3. Añadimos 500µl de tampón de homogenización con inhibidores de proteasas a una placa de cada condición y recogemos las células con ayuda de un *scraper*, la suspensión obtenida la usamos para recoger las células de otra placa de la misma condición, y así sucesivamente. De esta manera no incrementamos mucho el volumen del lisado.
4. Homogeneizamos las muestras sonicando durante 10" tres veces con intervalos de 10" y posteriormente pasamos la muestra 10 veces a través de una jeringa de 25G.
5. Recogemos el volumen (aproximadamente 1ml) del lisado y lo colocamos al fondo de un tubo de ultracentrífuga. Añadimos el mismo volumen de la solución de sacarosa al 80%. Lo mezclamos bien con ayuda de un vórtex. La concentración de sacarosa es ahora del 40%.
6. Con mucho cuidado y gota a gota, añadimos el mismo volumen (el resultado de restar 11ml, menos el volumen de solución al 40% que hay en el tubo y dividirlo por dos) de las soluciones de sacarosa al 35% y 5% sucesivamente, encima de la capa que le precede, de tal manera que se vean las interfases entre las soluciones con distinta densidad (gradiente discontinuo)
7. Centrifugamos los gradientes durante 20 horas a 4°C a 39000 rpm (200.000g) en una ultracentrífuga usando el rotor SW41Ti.
8. Descargamos el gradiente desde la superficie, ml a ml, con mucho cuidado de no mezclar las diferentes fracciones, y las pasamos a tubos eppendorfs. El *pellet* lo resuspendemos en 500µl de tampón de homogenización con IP.
9. Como en el protocolo 6.4.1, normalmente la banda enriquecida en *rafts* lipídicos/caveolas se encuentra entre las densidades 15-25% de sacarosa (fracciones 4-5). Aunque para comprobar si el aislamiento se ha realizado correctamente se procede al análisis del mismo volumen (20µl) de cada fracción mediante SDS-PAGE y *western blot*.

Si queremos precipitar las proteínas de alguna de las fracciones puedo hacerlo de dos maneras:

Método de deoxicolato 2% :

- Añadimos 1:100 volúmenes de deoxicolato 2%
  - Vórtex y 30 min. 4°C
  - Añadimos 1:10 de TCA (Tricloroacético 100%). Mezclamos con vórtex y dejamos o/n a 4°C
  - Centrifugamos 15 min. a 4°C. Lavamos con acetona a -20°C
  - Volvemos a centrifugar y dejamos secar el *pellet* (aire o bomba de vacío)
- Resuspendemos en LSB (añadimos gota a gota Tris-HCl pH 8.5 hasta que el color de la suspensión vire color azul ya que inicialmente es muy amarillo debido al pH ácido) si quiero procesar la muestra por SDS-PAGE.

Método Octilglucósido

- Colocamos 500 µl de la fracción en un eppendorf de 2 ml
- La diluimos 4 veces con el tampón MES 25mM, NaCl 150 mM y centrifugo 15 min. a velocidad máxima en una centrífuga de mesa

Resuspendemos el *pellet* en 200 µl del tampón de homogenización: 10 mM Tris pH8, 150mM NaCl, 1% Tritón-X-100, 60 mM octilglucósido e inhibidores de fosfatasa y de proteasas, que habitualmente se usa para inmunoprecipitar proteínas.

## 6.5 Análisis de la velocidad de migración en un gradiente de sacarosa.

### Materiales y reactivos:

- Tampón D (en nuestro grupo)	Tampón MBS (algunos autores)
Tris 20mM pH 8	Mes 25mM pH6,5
NaCl 150mM	NaCl 150mM
Tritón-X-100 1%	Octilglucósido 60mM
Octilglucósido 60mM	

- Tampón D con inhibidores de proteasas: Añadimos 1 pastilla del cóctel inhibidor de proteasas "C-complete" de Roche por cada 10ml de tampón.

- Soluciones del gradiente de sacarosa:

sacarosa 40% (w/v) en tampón D

sacarosa 5% (w/v) en tampón D

- Generación del gradiente continuo de sacarosa (5-40%): Usaremos una cubeta formadora de gradientes (dos vasos comunicados entre ellos por un pequeño orificio regulable situado en su parte inferior, uno de los vasos tiene una salida al exterior por otro orificio al que conectamos una cánula dirigida al tubo donde crearemos el gradiente). La cubeta se sitúa sobre un agitador magnético procurando que quede más alto que el tubo donde generaremos el gradiente. Colocaremos 6ml de la solución más concentrada en el vaso con salida al exterior y 6ml de la solución menos concentrada en el otro vaso. Abrimos la válvula de salida y una vez que haya comenzado a caer la solución más concentrada en el tubo (2-3ml se abre la válvula que conecta ambos vasos). El gradiente se formará al mezclarse la solución menos concentrada en el vaso que contiene la solución más concentrada.

### Procedimiento:

1. Partimos de adipocitos crecidos y diferenciados en placas de 10cm Ø (para un aislamiento óptimo suelen usarse 4-5 placas por condición)

2. Colocamos las placas en hielo, y las lavamos dos veces con 5ml de PBS frío y una vez con tampón D también frío. Aspiramos bien las placas.

3. Añadimos 500µl de tampón D con inhibidores de proteasas a una placa de cada condición y recogemos las células con ayuda de un *scraper*, la suspensión obtenida la usamos para recoger las células de otra placa de la misma condición, y así sucesivamente. De esta manera no incrementamos mucho el volumen del lisado.

4. Homogeneizamos las muestras pasando la muestra 10 veces a través de una jeringa de 25G. Dejamos 30'-1hora a 4°C en agitación para que se homogenice bien la muestra.

5. Elimino los restos celulares mediante una primera centrifugación a 22.000 g durante 10 minutos a 4°C.

6. Recojo el sobrenadante y lo cargo sobre un gradiente de sacarosa lineal (5-40%). Centrifugo los gradientes durante 10 horas a 340.000g (50.000 rpm en rotor SW60) o durante 16 horas a 39.000 rpm en rotor SW41.

7. Recogemos las 12 fracciones desde la superficie (ml a ml) y las colocamos en tubos eppendorfs.

8. Una parte de cada fracción puede analizarse directamente por SDS-PAGE y western blot.

9. O bien, podemos precipitar las proteínas de las fracciones deseadas como en el apartado anterior (6.4)

## 7 Técnicas de manipulación y detección de proteínas

### 7.1 Determinación de la concentración de proteínas

Existen distintos métodos para la valoración de la concentración de proteínas. En esta tesis se ha utilizado dos de ellos: el método de Bradford y el método de BCA. La elección de uno u otro depende de la presencia de detergentes en la muestra, en cuyo caso se recomienda el uso del método de BCA para evitar interferencias en la lectura de la absorbancia.

#### 7.1.1 Método de Bradford

El método se basa en el cambio del pico de absorbancia en una solución ácida de Coomassie Brilliant Blue G-250 cuando se une a proteínas. El cambio del máximo de absorbancia es de 465 a 595 nm. No se aconseja para muestras que contengan concentraciones significativas de detergentes ya que pueden interferir en la lectura de la absorbancia.

##### Material y reactivos:

- Solución comercial "BioRad Protein Assay" (Coomassie Brilliant Blue, ácido fosfórico y metanol) diluida 1/5 con agua milliQ (BioRad, 500,0006)
- Solución de  $\gamma$ -globulinas bovinas (1mg/ml) en tampón fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM) pH 7.4. Se conserva a  $-20^\circ\text{C}$ .
- Cubetas de plástico para espectrofotómetro de 1.5 ml de capacidad (aunque también puede hacerse en placas de 96 pocillos para un lector de ELISA).

##### Procedimiento:

1. Se prepara la cantidad necesaria de reactivo Bradford diluido teniendo en cuenta que se añade 1 ml por cubeta ( o 200ml por pozo de placa 96well) y que todas las muestras se hacen por duplicado (incluyendo la curva patrón).
2. La curva patrón comprende de 0 a 20  $\mu\text{g}$  de  $\gamma$ -globulinas.
3. En las cubetas se depositan de 2 a 10  $\mu\text{l}$  de las muestras. Se agitan las cubetas por inversión evitando siempre la formación de burbujas y pasados 5-10 minutos se mide la absorbancia a 595 nm. Cuando las proteínas están demasiado concentradas es necesario hacer diluciones en agua milliQ.

#### 7.1.2 Método BCA de Pierce

En el caso que la muestra contenga detergentes se utiliza el método de BCA, de la casa comercial Pierce (*Pierce BCA Protein Assay Reagent 23225*). Se basa en la reacción de Biuret. Las proteínas reaccionan con el cobre en la forma  $\text{Cu}^{2+}$ , formando  $\text{Cu}^{1+}$  en medio alcalino que reacciona con el reactivo BCA y forma un compuesto de color púrpura. La lectura de la absorbancia se hace a 562 nm y se utiliza una solución de albúmina 2 mg/ml para hacer la curva patrón.

##### Material y reactivos:

- Pierce BCA Protein Assay Reagent (23225, Pierce)
- Albúmina 2 mg/ml (Pierce, 23225)
- Placas de plástico de 96 pocillos
- Lector de ELISA (*Biowhittaker Microplate Reader 2001*)

Procedimiento:

1. El reactivo que contiene el  $\text{Cu}^{2+}$  (solución B) se diluye 1:50 con la solución de dilución (solución A).
2. En cada pocillo añadimos 10 o 20  $\mu\text{l}$  de muestra, y los valores de la recta patrón (de 0 a 20  $\mu\text{g}$  de albúmina) por duplicado.
3. Se añade 200  $\mu\text{l}$  de la solución del reactivo en cada pocillo
4. Como indican las instrucciones del *kit*, se incuba durante 30 min. a 37° C y se procede a la lectura de la absorbancia a 562nm.

## 7.2 Inmunoprecipitación de proteínas con anticuerpos específicos

La inmunoprecipitación es un método ampliamente usado para el análisis de antígenos diana que son reconocidos por anticuerpos específicos, permitiendo así el aislamiento de una proteína de un complejo proteico a partir de un extracto celular. Mediante el reconocimiento específico de la proteína/antígeno de interés por un anticuerpo específico unido a una matriz sedimentable, la proteína de interés es concentrada y purificada por inmovilización. El proceso de inmunoprecipitación incluye varios pasos:

- La solubilización de la muestra: como vimos en el apartado 6.1 la lisis celular y solubilización de la muestra puede hacerse de muchas maneras, y tiene que permitir que la proteína/antígeno de interés aparezca en la conformación y accesibilidad adecuada para ser reconocido por el anticuerpo y evitar que forme agregados que interfieran en este reconocimiento. Dependiendo de las características físico-químicas de la proteína y de su localización e interacción con otros elementos celulares, la solubilización se hará usando detergentes más o menos fuertes. Las condiciones se han de determinar empíricamente.

- Acoplamiento entre matriz y anticuerpo: Para la inmunoprecipitación, pueden usarse anticuerpos específicos (monoclonales o policlonales) de varias especies, y se unen a una matriz sólida sedimentable que permite la separación por centrifugación suave. Existen varias maneras de unir los anticuerpos a las matrices (de manera covalente a matrices de acrilamida o sefarosa, o bien de manera no covalente: proteína A/G-sefarosa). El que más se usa es la Proteína A/G que está covalentemente unida a bolas de agarosa.

- Inmunoprecipitación: Consiste en la incubación del antígeno solubilizado con el anticuerpo específico seguido por la formación del complejo antígeno-anticuerpo-matriz. Las proteínas que no se unen se eliminan mediante sucesivos lavados. La unión del anticuerpo a la matriz puede realizarse, previamente a la adición del antígeno o simultáneamente ya que en la mayoría de los casos la afinidad de la región Fc de los anticuerpos por la proteína A/G es muy alta. En este punto, puede añadirse un paso adicional de *preclearing*, en que el homogenado celular se incuba previamente a una mezcla de anticuerpo irrelevante y matriz (o sólo a la matriz) para reducir el número de uniones inespecíficas.

- Elución/lavados: Los lavados del complejo antígeno-anticuerpo-matriz permiten eliminar las proteínas que no se han unido al anticuerpo de manera específica. Modificando la fuerza iónica del tampón de lavado podemos eliminar proteínas unidas de manera inespecífica al complejo, aunque según las características del anticuerpo y su interacción con el antígeno, podríamos alterar o destruir esta interacción. De nuevo, las condiciones de lavado se han de comprobar de manera empírica.

En el caso de las inmunoprecipitaciones llevadas a cabo para el estudio de la vía de señalización de la insulina, se usó el siguiente protocolo.

Materiales y reactivos:

- PBS
- Tampón A pH 7,4 (ver apartado 6.1)
- Tampón A-Igepal 1%-Inhibidores de proteasas (apartado 6.1)
- Proteína A-sefarosa (sigma P-9424)
- Anticuerpos específicos: anti-fosfotirosina (Transduction Laboratorios)(Mouse)  
anti-IRS-1  
anti-PI3-quinasa p85 (Upstate biotechnology)(rabbit)

Procedimiento:

## Preparación de los extractos y solubilización

1. Este protocolo se lleva a cabo a partir de adipocitos crecidos y diferenciados en placas de 10cm Ø. Las células se ayunan durante dos horas con medio de ayuno (apartado 1.3.6), posteriormente se incuban con los tratamientos descolesterizantes (si es el caso) a la concentración y tiempo adecuados y/o con insulina 100nM en medio de ayuno durante 30 minutos.

2. Procedemos a la lisis y obtención de los extractos tal y como se explica en el apartado 6.1 de esta sección.

3. Valoramos las proteínas mediante el método BCA. Calculamos el volumen de muestra necesario para inmunoprecipitar 500-1000µg de proteína.

## Acoplamiento:

4. Por cada condición necesitamos 30µl de matriz de proteína A-sefarosa. Lavamos los 30µl de matriz colocados en un tubo eppendorf 3 veces con PBS; se añade 1ml de PBS, se mezcla por inversión, se centrifuga 3' a 3000 rpm en centrifuga de mesa y se retira el sobrenadante y dos veces con tampón A-Igepal1%.

## Inmunoprecipitación:

5. En el tubo eppendorf que contiene la proteína A-sefarosa, añadimos el volumen de muestra necesario para obtener 0,5-1 mg de proteína (según el anticuerpo), tampón A-Igepal1%-IP hasta un volumen de 300µl y 2-5 µl (2-6µg) del anticuerpo específico.

6. Incubamos la mezcla toda la noche a 4°C en un agitador orbital

## Lavados:

7. Centrifugamos las muestras durante 3' en una centrifuga de mesa a 4°C a 3000 rpm. Recogemos el sobrenadante en un nuevo tubo eppendorf, que alicuotamos y guardamos a -80°C para su posterior análisis. Es el control de material no inmunoprecipitado.

8. Lavamos el *pellet* de bolitas de sefarosa (que contiene el complejo proteína-anticuerpo-matriz) cuatro veces con tampón A-Igepal1%.

9. Elución: Añadimos 30µl de tampón LSB3x que contiene DTT 0,1M a cada muestra (*pellet* de bolitas de sefarosa). Hervimos las muestras durante 5 minutos a 95°C, y centrifugamos 3' a 3000 rpm en una centrifuga de mesa.

10. Recuperamos el sobrenadante que congelamos a -80°C o analizamos por SDS-PAGE y *western blot*.

### 7.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE

La electroforesis de proteínas en un gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) es uno de los sistemas más utilizados para separar proteínas en función de su masa molecular (Laemmli, 1970). Previo a la electroforesis, se añade a la muestra de proteínas tampón de



carga que contiene una cantidad de SDS suficiente para desnaturalizarlas y conferirles carga negativa. De esta manera, se mantiene constante la relación carga/masa. Cuando estas muestras se someten a un campo eléctrico establecido sobre un gel que contiene una malla del polímero acrilamida-bisacrilamida, las proteínas se resuelven en función de su tamaño.

En este tipo de electroforesis se preparan dos geles de diferente pH y concentración de acrilamida: gel concentrador y gel separador. En el gel concentrador la concentración de archilamida es más baja (3,3% en nuestro caso), y por tanto, el tamaño de poro de la malla formada al solidificarse la archilamida es más grande, en el, las proteínas se mueven muy rápido y permite que todas entren a la vez en el gel separador.

El gel separador, forma una malla más espesa y tiene como función separar las proteínas en función de su tamaño. El porcentaje de acrilamida del gel separador varía en función de la masa molecular de las proteínas que nos interesa separar. En paralelo a las muestras, se corren estándares preteñidos de diferentes tamaños moleculares, lo que nos permite visualizar la separación de las proteínas y calcular aproximadamente su tamaño molecular. En este trabajo se ha utilizado el sistema de electroforesis Mini-Protean (BioRad). Permite trabajar con volúmenes de muestra relativamente pequeños (20-100  $\mu$ l) y manipular fácilmente los geles. Una vez hecha la electroforesis, las proteínas se han detectado mediante *Western blot*.

#### Material y reactivos:

##### - Tampón de carga Laemmli x4 (LSB x4):

- 8 ml Tris-HCl 1.5 M pH 6.8
- 16 ml glicerol 80%
- 1.6g SDS
- 1 mg Azul de Bromofenol
- agua milliQ hasta 20 ml.

A partir de éste se hacen diluciones en agua milliQ para obtener LSB3X, LSB2X y LSB1X.

##### - Solución archilamida-bisacrilamida (30%-0,8%) (Pronadisa)

##### - Gel concentrador o *stacking gel*:

- Acrilamida/Bisacrilamida 3.3%
- Tris-HCl 0.125 M pH 6.8
- SDS 0.1%
- Persulfato amónico (APS) 0.1%
- TEMED 6.6 mM.

##### - Gel separador o *running gel*:

• Acrilamida/bisacrilamida (6%, 7.5%, 10%, o 12% según el tamaño de las proteínas que queremos separar).

- Tris-Base 0.375 M pH8.8
- SDS 0.1%
- Persulfato amónico (APS) 0.1%
- TEMED 2.2mM.

##### -Tampón de electroforesis x10:

- Tris-Base 250 mM
- glicina 1.9 M
- SDS 0.1%.

##### - Marcadores de tamaño molecular preteñidos (*Broad range molecular weight*)

markers; BioRad, 161-0318).

- DTT 2 M en agua destilada. Se conserva a  $-20^{\circ}$  C y cuando se descongela se mantiene en hielo.
- MiniProtean (BioRad)
- Jeringas Hamilton de 25, 50 y 100  $\mu$ l.
- Isopropanol

#### Procedimiento:

1 Polimerización de los geles: Se montan los vidrios del sistema de electroforesis según las instrucciones del fabricante. Se prepara el gel separador o *running gel* teniendo en cuenta que APS y TEMED son catalizadores de la reacción de polimerización por lo que se añaden en último lugar. El gel se vierte entre los vidrios hasta que el volumen ocupe 3/4 de éstos aproximadamente. Se deposita una ligera capa de isopropanol para nivelar el gel, eliminar burbujas de aire y evitar que el oxígeno inhiba la polimerización. Una vez polimerizado el gel (tarda 10-15 min. aproximadamente), se decanta el isopropanol y se añade el gel concentrador o *stacking gel*. Inmediatamente se coloca el peine sumergiéndolo en el gel y se deja que polimerice a temperatura ambiente.

2. Preparación de las muestras: En un tubo eppendorf se deposita la cantidad de proteínas deseada teniendo en cuenta el volumen máximo final que entra en el pocillo del *stacking gel*: 80  $\mu$ l en un peine de 10 pocillos de 1.5 mm. de grosor y 40  $\mu$ l en un peine de 15 pocillos de 1.5 mm de grosor, ambos para un sistema MiniProtean. Se añade LSB x3 necesario para que la concentración de LSB final sea x1. En el caso de que el volumen de la muestra sea muy grande se utiliza LSB x4. Cuando las muestras se tratan con DTT (para eliminar puentes disulfuro), éste se añade sobre la muestra con LSB a una concentración final de 100 mM. Se mezcla, se hierven las muestras a  $95^{\circ}$  C durante 5 min. y se centrifugan a 12000g durante 30s a temperatura ambiente. Mientras no se cargan, se mantienen en hielo.

3. Electroforesis: Una vez preparadas las muestras y polimerizado el *stacking gel* se sacan los peines, se colocan los geles en el sistema y se sumerge en una cubeta con tampón de electroforesis. Se cargan las muestras y los marcadores de peso molecular con una jeringa Hamilton. Se coloca la tapa con los electrodos y se conecta a una fuente de alimentación. Se fija el voltaje a 150V y se corre durante 1h-1h y 15' a temperatura ambiente. Finalmente, se desmonta el sistema y se separan los vidrios. A continuación, el gel se transfiere a una membrana de PVDF para análisis por Western blot.

## 7.4 Análisis western blot

El análisis *Western-blot* permite la identificación de una proteína separada por electroforesis mediante un anticuerpo que la reconoce específicamente. Para realizar este reconocimiento es necesario transferir las proteínas desde el gel a una membrana de PVDF o nitrocelulosa, de forma que quedan inmovilizadas por adsorción. Una vez transferidas, esta membrana se incuba con el anticuerpo primario y su presencia se revela con un segundo anticuerpo conjugado a peroxidasa que, en presencia de sustrato, genera un producto luminiscente. Se pueden utilizar otros métodos para detectar el anticuerpo primario.

El ensayo de western blot consta de dos pasos: la transferencia electroforética de las proteínas desde el gel de SDS-PAGE a la membrana y el ensayo de inmunoblot o detección de la proteína problema mediante la utilización de anticuerpos.

### 7.4.1 Transferencia

#### Material y reactivos:

- Tampón de transferencia pH 8.3: Tris-base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%
- Membrana PVDF (Inmobilon<sup>TM</sup>-P; Millipore, #IPVH00010)
- papel Whatmann 3MM
- Mini-Protean TransBlot Cell (BioRad)

#### Procedimiento:

1. Después de la electroforesis se descarta el *stacking gel* y el *running gel* se sumerge en el tampón de transferencia.

2. Se corta un trozo de membrana del mismo tamaño que el gel, se activa en metanol durante 1 min. y después se equilibra en tampón de transferencia. Se cortan dos trozos de papel Whatmann del mismo tamaño.

3. Se prepara una bandeja que contiene 500 ml de tampón de transferencia en la que se hace el montaje. Sobre la parte negra del soporte y en el siguiente orden se colocan una esponja, un papel Whatmann, el gel, la membrana, un papel Whatmann y una esponja. La membrana se puede marcar con lápiz en la parte superior izquierda para controlar la orientación con respecto al gel y saber el orden de carga de las muestras. Es muy importante que no queden burbujas entre el gel y la membrana porque eso impide la transferencia de las proteínas

4. Finalmente, se cierra el soporte procurando que no se muevan los elementos que hay en el interior. Se coloca en una cubeta de transferencia orientando la parte negra del soporte hacia el polo negativo de manera que las proteínas migren del gel a la membrana al desplazarse hacia al polo positivo. El sistema dispone de un bloque de hielo que evita un calentamiento excesivo.

5. Se llena la cubeta con tampón de transferencia y se aplica una corriente constante de 250 mA durante 1h. Si las proteínas que se quieren detectar tienen un peso molecular superior a 200 kDa, es conveniente resolverlas en un *running gel* con un 6% de acrilamida. En este caso, la transferencia se hace a 100 mA durante 16 h a 4° C. Una vez acabada la transferencia se desmonta el sistema procurando que la membrana no se seque.

### 7.4.2 Inmunodetección

Este proceso consiste en (i) el bloqueo de la membrana mediante la incubación en una solución rica en proteínas que evita la adsorción inespecífica del anticuerpo a la membrana, (ii) incubación con el anticuerpo primario, específico contra la proteína que queremos estudiar, (iii) incubación con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano HRP (*horse radish peroxidase*) que reconoce al anticuerpo primario y, (iv) la posterior detección con el sistema ECL (*Enhanced Chemiluminescence*) de la casa comercial Amersham.

#### Material y reactivos:

- Solución de bloqueo: depende del tipo de anticuerpo primario que se utiliza. En este trabajo se ha utilizado leche desnatada al 5% en PBS y la solución de bloqueo para el anticuerpo anti-fosfotirosina: 20 mM Tris pH6; 150mM NaCl; 0,05% Tween20; 0,1% Brij; 1% ovoalbúmina y 1% BSA en agua.

- Solución de anticuerpo primario: generalmente se prepara en la solución de bloqueo (5% leche) y azida sódica 0,02% aunque depende del tipo de anticuerpo. Así, el anticuerpo anti-fosfotirosina se prepara en la solución descrita para su bloqueo, y el anticuerpo anti-SSAO se prepara en una solución 0.1% Tween, y 0,8% gelatina de pez.

- Tampón de lavado: Tritón X-100 al 0,01 % en PBS

- Solución de anticuerpo secundario: Producido en burro 1:25.000 en solución de bloqueo. Se han utilizado anticuerpos diferentes según la especie en la que se ha desarrollado el anticuerpo primario. Están generados en burro (*donkey anti-rabbit*, *anti-mouse* de Jackson InmunoResearch) o en cabra (*goat anti guinea-pig*, Sigma-A5545) y tienen acoplada la peroxidasa HRP

- Reactivo ECL: este reactivo permite la detección de los anticuerpos conjugados con HRP debido a que la peroxidasa cataliza una reacción química que produce un sustrato luminiscente. (Amersham, #RPN 2209).

- Películas de revelado

#### Procedimiento:

1. Se preincuba la membrana con la solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. También se puede dejar toda la noche a 4°C.

2. Finalizado este tiempo se incuba con 5 ml de solución de anticuerpo primario (membrana de 9x5 cm) durante 16 h a 4° C o 1h 15 min. a temperatura ambiente con agitación orbital.

3. Para eliminar el exceso de anticuerpo y las interacciones inespecíficas de éste, se hacen 3 lavados de la membrana con tampón de lavado durante 10 min. a 37° C y en agitación.

4. Una vez lavada, se incuba con la solución de anticuerpo secundario durante 45 min.- 1 hora a temperatura ambiente y posteriormente se hacen 3 lavados de 5 min. a temperatura ambiente.

5. Se eliminan los restos de tampón de lavado con PBS, se cubre la membrana con un plástico para evitar que se seque y se añade 500 µl del reactivo ECL sobre la cara de la membrana que contiene las proteínas. Después de 1 min. se limpian los restos de reactivo y las proteínas se detectan con una exposición a un film autorradiográfico.

## **7.5 Reutilización de membranas de PVDF en ensayos de *western blot*: *stripping* de las membranas**

Una vez finalizado el ensayo western blot, las membranas de PVDF pueden reutilizarse para inmunodetectar otras proteínas. Mediante este protocolo se eliminan de la membrana los anticuerpos unidos y se dejan únicamente las proteínas que quedaron fijadas a la membrana durante la transferencia.

#### Materiales y reactivos:

- Tampón de *stripping*:

• Tris-HCl 62,5mM (pH 7,4)

• SDS 2%

• β-mercaptoetanol 100mM (se añade justo antes de usar el tampón, 70µl en 100ml)

- Tampón de lavado: PBS pH7,4 – 0,02% Tween-20

#### Procedimiento:

1. Se rehidrata la membrana de PVDF introduciéndola en metanol durante 1 minuto. Luego la hidratamos sumergiéndola en agua bidestilada.

2. Sumergimos la membrana en 100ml de tampón de *stripping* y la incubamos 30 minutos a 50°C en agitación constante.

3. Lavamos dos veces con PBS para eliminar los restos del tampón de *stripping*.

4. Introducimos la membrana en otra bandeja con 100ml de tampón de lavado y la incubamos 10 minutos a 37°C. Repetimos este proceso 3 veces.

5. Lavamos la membrana por último con PBS y continuamos con el ensayo de *western blot* bloqueando la membrana.

## 7.6 Tinción de geles con Coomassie Brilliant Blue

Todos los protocolos de tinción de geles implican la fijación de la proteína al gel. El método con Coomassie Brilliant blue, es un método barato, sencillo y capaz de detectar 0.1 µg de proteína.

### Material y reactivos:

- Solución de tinción: ácido acético 7.5%, isopropanol 25%, Coomassie Brilliant Blue 0.05%
- Solución desteñidora: ácido acético 7.5%, isopropanol 7.5%

### Procedimiento:

1. Se sumerge el gel en una cubeta con solución de tinción y se deja aproximadamente dos horas a temperatura ambiente en agitación suave.

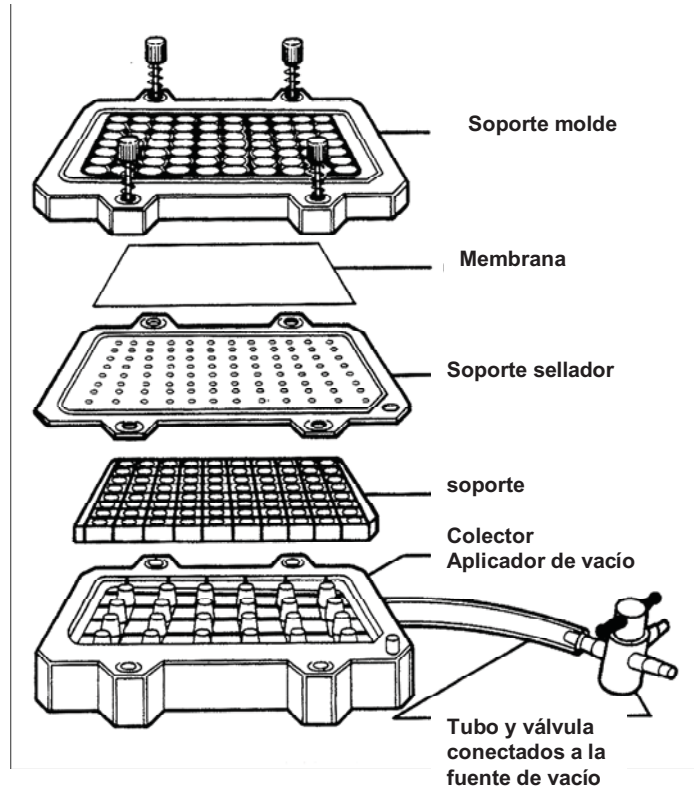
2. Se hacen varios lavados de 15 min. a 37° C con la solución desteñidora hasta que se observan las proteínas fijadas teñidas en el gel. También se puede dejar destiñiendo toda la noche a temperatura ambiente. De manera optativa, se puede secar el gel en un secador durante 1h 20 min. a 80° C para conservarlo.

La visualización de las proteínas que permanecen en el gel después de la transferencia sirve para ver la eficiencia de ésta y como control de la carga de los distintos pozos.

## 7.7 Inmovilización de proteínas y complejos de membrana por *dot blot*

Dot blot es una técnica para detectar e identificar proteínas o lípidos presentes en los extractos celulares, similar a la técnica de western blot pero difiere en que las proteínas de las muestras no se separan electroforéticamente sino que se distribuyen en puntos (spot) directamente sobre la membrana. De esta manera la solución que contiene el antígeno a estudiar (que puede ser un extracto celular de proteínas y lípidos, como es nuestro caso, o también un extracto de ácidos nucleicos, DNA o RNA) se aplica directamente sobre la membrana de nitrocelulosa y penetra en ella por simple gravedad. Las propiedades de la membrana permiten que la muestra quede retenida en ella (como ocurría en el western blot) y podemos proceder a su análisis con sondas o anticuerpos específicos.

Para realizar este tipo de ensayo hemos usado el equipo "Bio-Dot<sup>®</sup> Microfiltration Apparatus" (BioRad 170-6545), mediante el cual la membrana se coloca entre el soporte molde (que presenta los distintos puntos donde aplicaremos la muestra) y un soporte (que incluye una lámina de sellado) que está colocado sobre un proveedor de vacío. Cuando ensamblamos correctamente esta estructura, la membrana queda perfecta y herméticamente sellada al soporte molde (gracias a la aplicación de vacío) y permite la aplicación de la muestra en cada punto (spot) que penetra individualmente en su zona de la membrana sin que se mezcle con el resto de puntos de aplicación.



**Figura 7. Diagrama de ensamblaje del sistema Bio-Dot.** Adaptado de [www.bio-rad.com/cmcc\\_upload/Literature/13324/M1706545C.PDF](http://www.bio-rad.com/cmcc_upload/Literature/13324/M1706545C.PDF)

En nuestro caso, usamos este sistema para detectar un componente lipídico de membrana plasmática, especialmente abundante en los dominios lipid/raft caveola, el gangliósido GM1, a partir de extractos celulares de adipocitos 3T3L1, y usando la toxina colérica conjugada con peroxidasa de rábano (CTB-HRP) para detectar a GM1, ya que se une específicamente a este lípido.

Materiales y reactivos:

- Membranas de nitrocelulosa (BioRad 162-0113)
- Tampón TBS 1X: 20mM Tris-HCl pH7,5  
500mM NaCl
- TBS-Tween-20 0,05% (TTBS)
- Solución de bloqueo: TBS-1% BSA
- Solución para el anticuerpo (CTB-HRP): TTBS- 1% BSA  
Reactivo ECL (Amersham, #RPN 2209).
- Películas de revelado

Procedimiento:

1. Hidratar la membrana de nitrocelulosa sumergiéndola en TBS, antes de ensamblar el sistema tal y como se muestra en la figura 7.
2. Asegurarnos de que hemos sellado correctamente el sistema y que no existe filtración entre los puntos de aplicación.

3. Rehidratar la membrana aplicando aproximadamente 100 $\mu$ l de TBS por pocillo.
4. Añadir la muestra diluida en TBS (aproximadamente 20 $\mu$ l en 200 $\mu$ l finales) y dejar que drene hacia la membrana por gravedad (no aplicar vacío) (aproximadamente 30-40 minutos).
5. Realizar dos lavados aplicando 100-200 $\mu$ l de tampón TBS por pocillo para asegurarnos de que la muestra ha penetrado en la membrana.
6. Quitar la membrana del aparato y sumergir en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente.
7. Lavar en TTBS durante 5 minutos dos veces.
8. Incubar la membrana con la solución que contiene CTB-HRP (dilución 1:10000 en solución de bloqueo) durante 1 hora.
9. Lavar 3 veces durante 10 minutos con tampón TTBS
10. Por último se hace un último lavado con TBS para eliminar los restos de detergente y se incuba con el reactivo ECL durante un minuto para proceder al revelado como en el ensayo de *western blot*.

## 7.8 Análisis de proteínas en geles de dos dimensiones

Estos experimentos se llevaron a cabo siguiendo los protocolos y las instalaciones de la Unidad de Proteómica de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Barcelona en el Parque Científico.

### Preparación de las muestras

1. Resuspendemos el *pellet* de las muestras en 450  $\mu$ l de tampón de homogenización (7M tiourea/2M urea)
2. Las muestras se sonicán para asegurar una correcta homogenización: Amplitud mínima, cycle 0.05-0.2-0.4. Es muy importante que mantengamos frías las muestras.
3. Con una pipeta p20 añado 3  $\mu$ l de IPG buffer, mezclo con ayuda de un vórtex y añado 3  $\mu$ l de Azul Bromophenol (sumergiendo punta).
4. Aplicamos las muestras uniformemente sobre las tiras de pH (Amersham immobilized drystrip pH 3-11 NL, 24 cm), colocadas cuidadosamente sobre unos soportes con tapa. Encima, coloco las tiras de pH de 24cm que permite la migración de las proteínas (que quedan incluidas en su matriz de gel) en función de su punto isoeléctrico en presencia de un campo eléctrico. Añado 3ml aproximadamente de un líquido que evite la evaporación de la muestra sin mezclarse con ella (drystripcover fluid )

Sometemos las tiras a los distintos pasos:

- 20°C 50  $\mu$ A /step IEF
- S1 step-n-hold 50 Voltios (V) 12 horas
- S2 1h:30' gradiente 50->500V
- S3 1h:30' gradiente 500 -> 1000
- S4 1h:30' gradiente 1000 -> 2000
- S5 1h:30' gradiente 2000 -> 4000
- S6 2h gradiente 4000 -> 8000
- S7: acumulando hasta 75067 V de 8000V en 8000V
- S8 50 V 20 horas

### Preparación de los geles de acrilamida

Coloco en cubeta (tumbada, desmonto la parte de delante desatornillando, y coloco plásticos con esquinas romas hacia arriba), 3 plásticos gruesos y 1 fino, cristal + 1plástico fino+cristal+ fino+...+cristal+fino+3gruesos

Preparo 400 ml de solución de geles para 6 geles:

Acrilamida:	82.5ml de acrilamida normal+ 82.5ml de archilamida duracril (más resistente)
Tris HCl 1.5 M pH 8.8	100 ml
10% SDS	4ml
H <sub>2</sub> O	131 ml
APS 10%	0.2 g/2ml agua
Temed	267 µl

### Carga de los geles y Electroforesis

1. Equilibrado tiras: Sumergo las tiras en 10ml de tampón con DTT (10 mg/10 m) durante 15 minutos, y después otros 15 minutos en 10ml de tampón con Yodoacetamida (250 mg /10 ml)

2. Marcador de proteínas: Con papel de filtro hago 4 tiras con tijeras y pongo 2 µl /gel (golpeo con la pipeta en la tira de papel para que se seque allí)

3. Pongo a 90°C los tubos con agarosa, 1 ml por gel más otro por si acaso.

4. Añado el tampón de electroforesis del ánodo(7,5l) y tampón *running* (2,5l)

Aplicamos un campo eléctrico al sistema: durante 30' a 3V/gel (si tenemos 4 geles, a 13 voltios) y durante 5 horas a 19 V/gel (máximo 190 V en el equipo)

### Fijación de los geles

Sumergimos los geles en la solución de fijación:

40% etanol ( 800ml)

10% acético ( 200ml)

Agua milliQ (hasta 2l)

Dejamos toda la noche en agitación suave.

### Revelado

1. Lavado con agua milliQ **5min**

2. Sensibilización: **60min**

Acetato de Na 136 g en 2l

Tiosulfato Na 0,6g en 2l

Etanol 600 ml en 2l

3. Lavados: 6 x 8 min en agua milliQ

4. Tinción con Plata: **20 min**

Nitrato Plata 2g/2l

5. Revelado: Carbonato Na 30g/1l

Formaldehido 3% 750 µl / 1l

Agua miliQ hasta 1l

6. Lavado con agua milliQ rápido

7. STOP: 10 min

EDTA-Na 14.6 g/ 1l

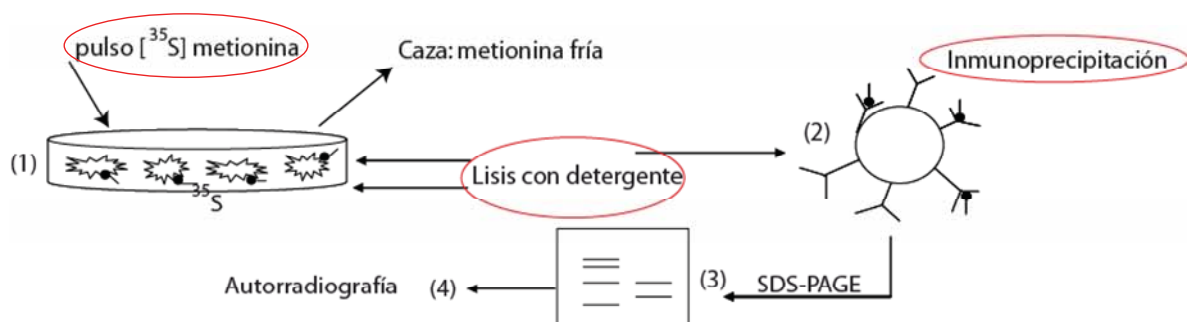
Agua milliQ

8. Lavado con agua milliQ



## 8 Ensayo de pulso y caza en adipocitos 3T3L1

El análisis de la degradación de las proteínas GLUT4 y receptor de insulina (IR) estudiadas en este trabajo se ha realizado mediante la técnica del pulso y caza (*pulse-chase*). Nos hemos basado en el protocolo descrito por (Sargeant *et al.*, 1993; Hresko *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 2007). Esta técnica permite estudiar la degradación de las proteínas en células siguiendo a una población de proteínas marcadas radiactivamente y sintetizadas durante un pulso radioactivo a lo largo del tiempo. El experimento de pulso y caza se puede dividir en cuatro fases: 1) Marcaje radioactivo (pulso) de las células con  $^{35}\text{S}$ -Metionina 2) Caza con un exceso de L-metionina fría. 3) Inmunoprecipitación de las proteínas. 4) Análisis en gel SDS-PAGE y autorradiografía.



### Material y Reactivos *Pulse-chase*:

- Campana de cultivos apta para el trabajo con radioactividad
- Botella dónde se recoge el líquido radioactivo aspirado
- Cubo de poliestireno con hielo
- Cubo de poliestireno con hielo, tapado con una hoja de aluminio para acelerar el enfriamiento de las placas.

- Papel impermeable BENCHGUARD (BG50 Bibby Sterlin)
- L-Metionina (50X) en  $\text{H}_2\text{O}$ , congelada a  $-20^\circ\text{C}$  (250mM Sigma # M-5308)
- PBS1X
- **Medio de ayuno** (Gibco # 12-707F): 500 ml DMEM (4,5 g/l glucosa, sin L-glutamina, L-metionina ni L-cisteína., suplementado con L-glutamina y 10% FBS dializado (*Fetal Bovine Serum Dyalized*. Gibco # 26400-036) previamente inactivado. Este suero no contiene aminoácidos, así, durante el tiempo que dure el ayuno, las células no podrán sintetizar proteínas *de novo* y durante el pulso, la síntesis de proteínas que ocurra incorporará la metionina marcada con  $^{35}\text{S}$  que le añadamos.

- **Medio de marcaje radioactivo:** medio de ayuno con  $110\mu\text{Ci/placa}$  de metionina- $[\text{S}^{35}]$ . El medio de marcaje radioactivo se prepara fresco cada vez. *Stock* radioactivo (PerkinElmer Life Sciences).

- **Medio Caza** : Medio completo de crecimiento de adipocitos (DMEM 10%FBS, apartado 1.3.5), suplementado con L-metionina  $100\mu\text{g/ml}$  fría. El medio se prepara fresco cada vez.

### - **Tampón de lisis:**

- TrisHCl      50mM pH 8
- NaCl        150mM

- EDTA 1mM
- Igepal (NP40) 1%
- SDS 0.1%
- Inhibidores de proteasas: una pastilla de c-complete de Roche por cada 10ml de solución preparados
- Líquido de centelleo EcoLite (ICN)

#### Material y reactivos inmunoprecipitación y SDS-PAGE

- Proteína A sepharose 4B (Sigma # P-9424) en PBS.
- Anticuerpos específicos: anti-GLUT4 (suero de conejo purificado por inmunoadfinidad) anti- receptor de insulina (IR)(Transduction Laboratories)
- 
- DTT 2M congelado a - 20°C.
- Aparato SDS-PAGE, sistema miniprotean (*BioRad*)
- Solución de tinción Coomassie y desteñidora (ver apartado 7.6)
- Papel Whatmann 3MM
- Equipo para secar geles (*Stacked Gel Dryer SGD300 Vacuum Savant*)
- Pantalla (*Storage pHosphor screen, Molecular Dynamic*)
- Escaner Typhoon 8600 (*Molecular Dynamics Amersham/Biosciences*)

#### Procedimiento:

##### PULSO

1. Partimos de adipocitos crecidos y diferenciados en placas de 60 mm de diámetro
2. Ayuno de las células: Lavamos las placas con 5ml de PBS dos veces y añadimos 2ml de medio de ayuno. Incubamos a 37°C durante dos horas.
3. Cambiamos el medio de ayuno por medio de marcaje radiactivo, 2ml/placa. Incubamos durante 12 o 16 horas) en un incubador de células a 37°C, 95% de humedad y 10% CO<sub>2</sub>.

##### CAZA

4. Lavamos las células tres veces con PBS y las incubamos con 4ml de medio de caza (suplementado con metionina fría) durante los tiempos deseados. Durante este tiempo, el conjunto de proteínas marcadas (sintetizadas durante el pulso) se degradarán.
5. Pasado el tiempo de caza deseado (2, 4, 6,...24 horas) colocamos las placas en hielo, las lavamos dos veces con PBS frío y las congelamos a -80°C o proseguimos con la lisis e inmunoprecipitación.

##### INMUNOPRECIPITACIÓN

6. añadimos 1ml de tampón de lisis. Recogemos las células con ayuda de un *scraper* y las pasamos a un tubo eppendorf. Allí homogeneizamos el extracto pasándolo 10 veces por una jeringa de 25G.
- 7 Centrifugamos las células a 12000g en una centrífuga de mesa a 4°C, recogemos el sobrenadante y lo pasamos a un tubo limpio.
8. El sobrenadante es sometido a un paso de preclearing (ver apartado 7.2) incubándolo durante 2 horas con 40µl de bolitas de proteínaA-sefarosa a 4°C. Posteriormente se centrifuga durante 3' a 3000rpm y se recoge el sobrenadante.
9. El sobrenadante se incuba con 5µl de anticuerpo GLUT4 e IR y 40µl de bolitas de proteínaA-sefarosa durante toda la noche a 4°C.
10. Centrifugamos durante 3' a 3000rpm y guardamos el sobrenadante (para comprobar la eficiencia de la inmunoprecipitación). Lavamos el pellet, primero una vez con tampón de lisis que contiene 0.5% de igeal (en vez del 1%), una vez con tampón de lisis que

contiene 1M de NaCl (en vez de 150mM), dos veces más con tampón de lisis que contiene 0.5% de igepal y una vez con PBS.

11. Las proteínas se eluyen añadiendo 30 $\mu$ l de tampón LSB3X (contiene SDS) e incubando 1 hora a 37°C y agitación en el caso de las muestras inmunoprecipitadas con anti-GLUT4, y 5 minutos a 95° añadiendo al tampón LSB, DTT a una concentración 0,1M.

12. Centrifugamos las muestras (3' a 3000rpm) y recuperamos el sobrenadante (el paso de elución lo repetimos dos veces).

#### ANÁLISIS POR SDS-PAGE Y AUTORADIOGRAFÍA

13. Analizamos las muestras por SDS-PAGE (apartado 7.3 de esta sección)

14. Teñimos los geles usando la solución Coomassie (apartado 7.6)

15. Colocamos los geles ya desteñidos sobre un papel whatmann previamente humedecido con agua, y lo dejamos secar durante 1 hora a 80°C en un secador con bomba de vacío.

16. Las proteínas marcadas radiactivamente se detectan con una exposición a la pantalla (*Storage p<sup>H</sup>osphor screen, Molecular Dynamic*) durante 3 días o más y se analizan con el escáner Typhoon 8600 (*Molecular Dynamics Amersham/Biosciences*).

Para medir la radiactividad incorporada a las proteínas

- Se corta una tira de papel Whatmann 3MM y se divide en cuadrados con un lápiz. Se añaden 2  $\mu$ l de lisado en cada cuadrado y se deja secar unos minutos.

- Se pone la tira de papel en una bandeja y se lava 3 veces con TCA (ácido tricloroacético) 10% durante 5 minutos en agitación a RT.

- Se seca la tira de papel 1' en microondas.

- Se cortan los cuadrados y se introducen en un vial que contiene 3 ml de líquido de centelleo. Se agita unos segundos y se cuentan las d.p.m. totales con el programa QuantaSmart™

## 9 Aislamiento de gotas lipídicas de adipocitos 3T3L1

### 9.1 Obtención de gotas lipídicas para el análisis de sus proteínas asociadas

#### Materiales y reactivos:

Medio hipotónico: 10mM HEPES-NaOH pH 7,3

1mM EDTA

Inhibidores de proteasas: PMSF 0,5mM (stock 50 mM (100x))

Aprotinina 2 $\mu$ g/ml (stock 100x)

Pepstatina 2 $\mu$ M (stock 2mM (1000x))

Leupeptina 2 $\mu$ M (stock 2mM (1000x))

#### Procedimiento:

Partiremos de un número elevado de placas de adipocitos 3T3L1 crecidos en placas de 10cm  $\varnothing$  (10-20 placas).

1. Lavamos las células dos veces con PBS y una vez más con medio hipotónico sin inhibidores de proteasas.

2. Añado a cada placa 2ml de medio hipotónico, recojo las células con ayuda de un *scraper* y las paso a un homogeneizador de vidrio potter donde las resuspendo con una pipeta pasteur de plástico y las dejo en hielo (en el tiempo en que repito el proceso con todas las placas las células se habrán hinchado debido y que se encuentran resuspendidas en un medio hipotónico). Después de 10 minutos, liso todo el volumen celular (25-30ml) usando un émbolo de teflón a una velocidad de 1500 rpm.

3. Centrifugo las muestras a 20.000 g (11300rpm en rotor JS 13.1) durante 20 minutos a 4°C. Recupero la grasa que queda en la parte superior del tubo con ayuda de una pipeta pasteur de plástico, y la coloco en un tubo de ultracentrifuga de 12ml.

4. Añado medio hipotónico hasta completar el volumen del tubo (12ml) y centrifugo las muestras a 39.000 rpm en un rotor SW41Ti durante una hora a 4°C. Recojo la capa lipídica que queda en la parte superior del tubo y repito el proceso 4 veces más. El último lavado lo realizo con agua para limpiar de sales la preparación de gotas lipídicas.

## 9.2 Obtención de los lípidos de adipocitos 3T3L1 para analizar su composición lipídica mediante TLC

### Materiales y reactivos:

- <sup>14</sup>C<sub>1</sub>-Ácido Oleico (code: CFA243) (100μCi/ml, es decir, 0.1 μCi/μl) (1mCi son aprox. 2.2 x 10<sup>6</sup> dpm). Añadiremos 4μCi/μmol de ácido oleico añadido a las células.

- BSA (fatty acid free, sigma A6003)

- Stock ácido oleico frío 100mM esterificado con NaOH en una proporción 1.2 moles de NaOH : 1 mol ácido oleico. Para prepararlo mezclamos:

- 28,45 mg de ácido oleico (Mw 284.5). en 1 ml de H<sub>2</sub>O = 0.1mmoles ácido oleico.
- Tengo que añadirle 0.128 mmoles NaOH, es decir, 60 μl de una solución 2M

Dejo que se disuelva en *thermoblock* a 70°C en agitación suave (ojo!! No invertir el tubo). Se guarda congelado a -20°C

- Solución radiactiva de incubación: Consiste en medio DMEM de ayuno (1.3.6) al que no le hemos añadido BSA.

• La incubación la haremos con ácido oleico 50μM. es decir 50nmoles/ml. Por tanto añadiremos 0,5μl de la solución stock de ácido oleico frío 100mM por cada ml de solución radiactiva de incubación que preparemos.

• <sup>14</sup>C<sub>1</sub>-Acido Oleico (0.1 μCi/μl): Necesitamos 4 μCi/μmol de ácido oleico, por tanto, añadiremos 0,2μCi por ml de solución radiactiva de transporte, es decir, 2μl de la solución stock <sup>14</sup>C<sub>1</sub>-Acido Oleico (0.1 μCi/μl)

• BSA (Mw 60.000): la relación ácido oleico : BSA es 2,5 : 1. Por tanto, en 1ml de medio de solución radiactiva de transporte tengo que añadir 20nmoles (1,2mg) de BSA.

Para preparar la solución radiactiva de incubación calcularemos el volumen total que necesitamos, 1ml/pozo de placa *6well*, por ejemplo 30ml para 4 placas, y procedemos igual que para preparar la solución radiactiva de transporte del apartado 5.5 de esta sección. Aunque en este caso, el medio de ayuno después de añadirle el BSA, es filtrado a través de filtros de 0,2 μm.

- Reactivo DOLE: Compuesto por 40 partes de Isopropanol, 10 de heptano y 1 de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Volumen / 51 \* partes; ej. 300/51\*40 ml de isopropanol)

Procedimiento:

1. Partimos de adipocitos 3T3L1 crecidos en placas *6well* y procedemos a marcar sus lípidos de la misma manera que en apartado 5.6 de esta sección. Brevemente, lavamos las células tres veces con PBS para eliminar los restos de suero. A continuación, incubamos las células durante 2 horas con medio de ayuno (ver apartado 1.3.6) (2ml/pozo placa *6well*)

2. Añadimos 1ml de la solución radiactiva de incubación a cada pozo de la placa *6well*, y dejamos las placas incubando toda la noche en un incubador a 37°C, 95% de humedad y 10% CO<sub>2</sub>

3. Tras 16 horas de incubación, retiramos el medio y lavamos las células 3 veces con tampón PBS-0,5%BSA para eliminar toda la radiactividad no incorporada a las células. En este momento podemos proceder directamente a la extracción de lípidos o a la incubación con efectores β-adrenérgicos como en el apartado 5.6 de esta sección y posterior extracción de lípidos, para ver el efecto de estos compuestos sobre la composición lipídica en los adipocitos

4. La extracción de lípidos se realiza añadiendo 2ml del reactivo DOLE por pozo. La placa *6well* se sella con parafilm y se deja agitando a temperatura ambiente durante al menos 2 horas.

5. Una vez transcurrido este tiempo, se recoge el sobrenadante mediante fuerte pipeteo y se coloca en tubos de 15ml donde previamente hemos añadido 800µl de agua y 1,2ml de heptano (este proceso, así como la adición del reactivo DOLE a las placas, se ha de realizar en la campana de extracción de gases)

6. Los tubos se agitan fuertemente mediante vórtex. Se dejan reposar durante 5 minutos.

7. Tomamos 1ml de la fase superior orgánica y los ponemos en nuevos tubos de 2ml, que congelamos a -20°C, o procedemos directamente a la evaporación del solvente por centrifugación suave en una cámara de vacío (*speed-vacuum centrifuge*). El precipitado que obtenemos constituye la fase lipídica de los adipocitos, que congelamos a -20°C o procedemos a resuspenderlos en el volumen deseado (200µl) de cloroformo para su análisis por TLC.

## 10 Separación de lípidos por cromatografía en gel de capa fina (TLC)

Materiales y reactivos:

- Placas de cromatografía de 20 por 20 cm: capa fina (0.25 mm) de Silicagel sobre soporte de vidrio

- Lípidos patrones:

- Fosfatidiletanolamina (FE) 10 mg/ml en cloroformo/metanol 4:1
- Fosfatidilcolina o lecitina (FC) 10 mg/ml en cloroformo
- Colesterol (C) 10 mg/ml en cloroformo
- Ácido palmítico o palmitato (AP) 10 mg/ml en cloroformo
- Tripalmitina (TP) 10 mg/ml en cloroformo
- Palmitato de colesterol (CP) 10 mg/ml en cloroformo

- Eluyentes

- Cloroformo (Triclorometano)/Metanol/Agua (CMA) (345:133:21, en volumen)
- Hexano/Éter dietílico/Ácido fórmico (HEF) (392:98:10, en volumen)

- Yodo en escamas

### Procedimiento:

1. Saturar la cámara cromatográfica con el eluyente: añadir 100ml del eluyente, colocar verticalmente un trozo de papel de filtro en el tanque, asegurar el correcto cierre de la cámara

2. Preparación de las placas: Las placas de silicagel se deben tratar con cuidado para no mancharlas. Antes de aplicar los patrones y las muestras, la placa se prepara marcándola suavemente con un lápiz. Se marca una línea (origen de la migración) de lado a lado de la placa (20cm) a 2cm de su extremo inferior. Después con finas rallas perpendiculares a la anterior, marcamos los futuros puntos de aplicación de los lípidos, separado al menos 1,5cm entre ellas, y 3cm de los márgenes de la placa.

3. Aplicación de los lípidos en el origen: Usamos una pipeta de 20 $\mu$ l para colocar las muestras o patrones en cada punto de aplicación. Cargamos el volumen total mediante sucesivas aplicaciones de 20 $\mu$ l, secando con un secador de aire cada vez para asegurarnos la mínima superficie del punto de origen.

4. Cromatografía: Una vez aplicados los patrones y muestras, colocamos las placas dentro de la cámara de cromatografía, con la línea de origen en el fondo, de tal manera que el eluyente quede por debajo de la línea de origen (si no, los lípidos quedarían disueltos en el eluyente fuera de la placa). Dejamos que discurra la cromatografía hasta que el eluyente llegue a unos 2cm del extremo superior de la placa.

5. Entonces extraemos la placa y rápidamente marcamos el frente de la cromatografía con un lápiz. Se deja evaporar el eluyente en la campana de extracción.

6. Revelado: En el caso de que queramos ver los lípidos marcados radiactivamente, colocamos la placa en un caset y detectamos el marcaje radiactivo con una exposición usando una pantalla (*Storage p<sup>H</sup>osphor screen, Molecular Dynamic*) durante 3 días o más y se analizan con el escáner Typhoon 8600 (*Molecular Dynamics Amersham/Biosciences*).

Para detectar los lípidos totales (marcados y no marcados) de las muestras y los patrones cargados el revelado se realiza colocando la placa dentro de un tanque que contiene yodo en el fondo para que los vapores de yodo impregnen toda la placa. El yodo revela cualquier compuesto presente, no sólo lípidos. Como teóricamente se han aplicado sólo lípidos, las manchas que aparecen a distintas distancias del origen corresponden a los diferentes tipos de lípidos. Marcamos rápidamente las manchas con un lápiz ya que el yodo se evapora rápidamente. Identificamos las especies de lípidos de las muestras comparando su migración desde el origen con la de los patrones conocidos.

## **11 Técnicas de obtención, manipulación y detección de DNA**

En la realización de esta tesis se han aplicado distintas técnicas de manipulación del DNA que son comunes en todos los laboratorios de Biología Molecular. Toda esta metodología se puede encontrar de manera detallada en cualquier manual de laboratorio de Biología Molecular, como por ejemplo "Molecular Cloning. A Laboratory Manual" (Sambrook, 1989) o "Current Protocols in Molecular Biology" (Coligan, 2001).

El trabajo con DNA y bacterias requiere la utilización de material estéril para evitar contaminaciones con DNAsas, otras bacterias o DNAs ajenos. Este material se esteriliza en el autoclave a 1 atmósfera de presión durante 20 minutos.

La manipulación de bacterias se realiza al lado de un mechero Bunsen que proporciona un área de trabajo estéril.

Las soluciones se preparan con agua ultrapura (sistema MilliQ de Millipore) y se esterilizan en autoclave o por filtración mediante filtros de 0,22µm de diámetro de poro.

### 11.1 Obtención de bacterias competentes

Para mantener y amplificar plásmidos, éstos se transforman en las cepas de *E. coli* DH5α y XLBlue desarrolladas por Stratagene. Las bacterias que se utilizan se denominan competentes porque están sometidas a un proceso de sensibilización a la transformación. Una vez que las bacterias son transformadas son sembradas en placas con antibiótico, donde sólo crecen las bacterias que han incorporado el DNA plasmídico exógeno.

El protocolo de obtención de bacterias competentes que se ha utilizado en este trabajo es una adaptación del protocolo descrito por Cohen en 1972 en el que las bacterias se tratan con una solución de cloruro de calcio para alterar la pared bacteriana y facilitar la entrada de DNA exógeno (Cohen and Schenker, 1972).

Materiales y reactivos:

- CaCl<sub>2</sub> 0,1M estéril
- CaCl<sub>2</sub> 0,1M + 15% glicerol estéril
- Medio LB (ver apéndice I)

Procedimiento:

Rutinariamente usamos los volúmenes que se indican, pero pueden variar según las necesidades.

1. Se inoculan 4 ml de medio LB con la cepa bacteriana de interés, y se incuban a 37°C en agitación (200rpm) toda la noche.

2. Se sacan 0,5ml del cultivo bacteriano y se añaden a 100ml de LB sin antibióticos. Se incuban a 37°C en agitación. Cada 30 minutos, se extrae 1ml de medio y se lee su absorbancia a 600nm. Repetimos este paso hasta que el cultivo llega a una densidad óptica de 0,4-0,5 unidades de absorbancia (2-4 horas). Esta densidad óptica se corresponde con una concentración de  $5 \times 10^7$  células/ml y a un estado de crecimiento exponencial del cultivo. Densidades superiores a  $10^8$  células/ml disminuyen sustancialmente la eficiencia de la transformación.

3. Se distribuye el cultivo en dos tubos de 50ml estériles y se mantienen en hielo durante 2 minutos.

4. Se centrifuga la suspensión a 4000rpm a 4°C durante 10 minutos.

5. Se decanta el sobrenadante y se resuspenden las células en 10ml de solución CaCl<sub>2</sub> fría. Se resuspende las células suavemente.

6. Centrifugamos de nuevo la suspensión a 4000rpm a 4°C durante 10 minutos. Se repite este lavado dos veces.

7. Decantamos el sobrenadante y resuspendemos las células en 2ml de solución CaCl<sub>2</sub>-15% glicerol estéril.

8. Las bacterias se pueden transformar a continuación o bien congelar en N<sub>2</sub> líquido y guardarlas a -80°C en alícuotas de 200µl para su uso posterior.

### 11.2 Transformación

Consiste en la incorporación de DNAs exógenos por parte de las bacterias. Estos DNAs circulares son plásmidos que pueden contener el DNA que nos interesa e incluyen en su secuencia un gen que garantiza la selección de las bacterias que incorporan el plásmido. Generalmente, estos genes proporcionan una resistencia a un antibiótico como la ampicilina o la kanamicina. Los dos métodos de transformación más usados en nuestro grupo son: (i) la transformación por choque térmico y (ii) por electroporación (*Cell Porator*, Gibco), cuyo protocolo se detalla en el manual de instrucciones del mismo. La elección de uno u otro

depende de la cantidad de plásmido a transformar. Sólo se utilizará el segundo método cuando la cantidad de DNA circular sea mínima, como ocurre tras varios pasos de digestión y purificación. En este trabajo se ha usado la electroporación por choque térmico que se describe a continuación:

1. Se añaden aproximadamente 50ng del DNA a 100µl de bacterias competentes descongeladas en hielo. Se mantiene la mezcla en hielo durante 30 minutos. Esto permite la adsorción del DNA a la superficie de las bacterias.
2. Se realiza el choque térmico incubando la mezcla a 42°C durante 45”.
3. Se añaden 900µl de medio LB y se incuban a 37°C en agitación durante 1 hora. Durante este tiempo las bacterias que han incorporado el plásmido expresan la resistencia al antibiótico que permitirá su selección.
4. Se siembra todo o parte del cultivo en una placa de LB agarosa que contenga el antibiótico que permite la selección de las bacterias transformadas. Se deja que el agar absorba la mezcla y se incuba la placa en posición invertida a 37°C hasta que aparezcan las colonias (12-18 horas)

### 11.3 Recuperación de DNA plasmídico

Para purificar los plásmidos a partir de cultivos bacterianos se utilizan *kits* comerciales en función de la cantidad y de la calidad de DNA que se necesita: preparaciones a pequeña escala con fines analíticos (minipreparaciones o *minipreps*)(Sigma, #PLN-350) y a gran escala para obtener del orden de 2.5 o 5 mg (Qiagen, #12163 y #12191, respectivamente).

### 11.4 Análisis de DNA con enzimas de restricción

La digestión de DNA con estas enzimas se realiza siguiendo las instrucciones de las casas comerciales que los suministran. En general, se utiliza el tampón comercial indicado. La cantidad de enzima nunca debe sobrepasar el 10% del volumen final ya que el glicerol al 50 % que contiene puede inhibir la reacción enzimática. Generalmente se utiliza entre 1 y 5 U/µg de DNA y la reacción se lleva a cabo a la temperatura indicada para cada enzima. Cuando se trata de digestiones dobles o triples y el tampón de los enzimas es incompatible, el DNA digerido se extrae del tampón con fenol-cloroformo o usando el *kit* de purificación de bandas comercial (Amersham, #27-9602-9) o bien se purifica en un gel de agarosa antes de proceder con la siguiente digestión.

Un ejemplo de reacción de restricción típica para comprobar la presencia de un inserto de DNA en un vector a partir de la solución plasmídica procedente de una minipreparación (100-200ng/µl) sería:

Plásmido (miniprep)	3 µl
TPX10 enzima	2 µl
Enzima (10U/µl)	0.2 µl
H <sub>2</sub> O	14.8 µl

Mantener 1-2horas a la temperatura indicada por el fabricante para el enzima (generalmente 37°C)



## 11.5 Extracción de DNA con fenol-cloroformo y precipitación con etanol

### Materiales y reactivos:

- Fenol tamponado (*buffered-saturated phenol*; GIBCO BRL 15513-039)
- Cloroformo (Carlo Ebra)
- Acetato sódico 3M pH5,2 (Sigma S-7899)
- Etanol absoluto
- Etanol 70%

### Procedimiento:

1. Al volumen de la digestión (u otra preparación de DNA que queramos limpiar de sales) (generalmente 20-50 $\mu$ l) se le añade agua bidestilada hasta un volumen final de 200 $\mu$ l.
2. Se añaden 100 $\mu$ l de fenol tamponado y el mismo volumen de cloroformo. Se mezcla bien con agitador vórtex y se centrifuga 2 minutos a 12.000g en una centrifuga de mesa a temperatura ambiente.
3. Se recupera la fase acuosa superior (aproximadamente 200 $\mu$ l) y se coloca en un tubo eppendorf limpio.
4. Se añade el 10% del volumen (20 $\mu$ l) de acetato sódico y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío (950 $\mu$ l) y se mezcla por inversión. Se deja precipitando a -80°C durante 30-60 minutos.
5. Se centrifuga a temperatura ambiente durante 30 minutos y se aspira el sobrenadante resultante. El precipitado formado se lava con etanol 70% frío y se deja secar a temperatura ambiente.
6. El DNA se resuspende en agua MilliQ.

## 11.6 Ligación

La obtención de nuevas construcciones es posible gracias a las técnicas de DNA recombinante. El protocolo de incorporación de fragmentos de DNA en un plásmido (ligación) utilizado en esta tesis ha sido estándar {Sambrook J., 1989 491 /id}. Las proporciones molares de inserto/vector que se recomiendan han sido modificadas según la medida del inserto y la eficiencia de ligación; solemos poner la misma cantidad en ng de ambos fragmentos, por ello la relación molar es diferente.

$$\text{ng inserto} = \frac{\text{ng vector} \times \text{kb inserto}}{\text{Kb vector}} \times \text{relación molar (vector/inserto)}$$

El protocolo seguido ha sido el mismo para unir fragmentos con extremos romos o cohesivos. Se ha procurado minimizar la exposición del DNA a ligar a los rayos UV, que pueden alterar su estructura y disminuir la eficiencia de la ligación.

### Reactivos y soluciones:

- T4 DNA ligasa (de Boehringer o a veces de BioRad (3U/ $\mu$ l)).
- Tampón de ligación, pH 7,5 10X (suministrado con el enzima).

### Procedimiento:

1. Se mezclan los fragmentos que se van a ligar procurando mantener una relación molar inserto/vector de 3 a 1 y que la cantidad total de DNA sea de aproximadamente 100 ng.

El volumen de la reacción suele ser de 10  $\mu$ l. Se añade 1  $\mu$ l de tampón de ligación y 1  $\mu$ l de T4 ligasa.

2. Se incuba a 17°C durante 16-18 horas.

3. El producto de ligación se transforma en bacterias competentes y los plásmidos se analizan por restricción. En ligaciones en las que el vector tiene la posibilidad de religarse, este se ha defosforilado previamente a la ligación (extremos 5') con fosfatasa alcalina (calidad para biología molecular).

### 11.7 Clonación de productos de PCR en un vector pGEM-T Easy

En algunos casos ha resultado útil clonar productos amplificados por PCR directamente en un vector (como el producto de amplificar el transcrito de caveolina-1 a partir del cDNA obtenido del RNA de adipocitos 3T3L1). En estos casos la opción escogida ha sido la clonación en el vector pGEM-T Easy incluido en el *kit* del mismo nombre de Promega.

Brevemente se trata de un vector abierto por un sitio de clonación múltiple (ecoR V) al cual se han añadido dos timidinas en los extremos 3'. Muchas polimerasas de DNA añaden una adenina en los extremos 3' de los productos amplificados (actividad desoxiadenina terminal transferasa) de manera que se puede ligar al vector fácilmente mediante una reacción de ligación a través de las timidinas protuberantes

Se procede según las instrucciones del producto, mezclando:

- Tampón de ligación 2X      5  $\mu$ l
- Vector pGemT                1  $\mu$ l
- T4 DNA ligasa                1  $\mu$ l
- Inserto PCR                    3  $\mu$ l

Dejar 2 horas a T<sup>a</sup> ambiente

Nota: En el caso de clonar productos procedentes de una amplificación con una DNA polimerasa sin actividad dA terminal transferasa (como la Pfu polimerasa), se pueden añadir fácilmente las adeninas añadiendo 1 $\mu$ l de dATP 2 mM a la mezcla de PCR, 1U de Taq polimerasa e incubando 5' a 96°C seguido de 20' a 72°C (también se puede hacer sobre el producto de PCR purificado suplementado convenientemente con el tampón de la polimerasa)

### 11.8 Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa no desnaturante es un método estándar que se utiliza para separar fragmentos de DNA. La migración de estos fragmentos en el gel es inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular. El porcentaje de agarosa que se utiliza depende del tamaño de los fragmentos a separar (1% de agarosa separa fragmentos de entre 0.4 y 6 kb). Para resolver fragmentos más pequeños se recomienda un porcentaje superior o una electroforesis en un gel de acrilamida. Siempre se resuelven marcadores de peso molecular (1 kb DNA; Gibco BRL, # 15615-016) en paralelo a las muestras.

### 11.9 Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa

Los fragmentos de DNA separados en un gel de agarosa se recuperan con el objetivo de ligarlos a otros fragmentos o utilizarlos como sondas, entre otras finalidades. En este trabajo se ha utilizado un *kit* comercial (Amersham, #27-9602-9) y seguido las instrucciones de la casa proveedora.

## 11.10 Otros enzimas usados

Cuando se hacen construcciones de fragmentos de DNA en plásmidos es necesario el uso de otros enzimas. En este trabajo se han utilizado enzimas como la fosfatasa alcalina, que corta el grupo fosfato del extremo 5' de un fragmento de DNA e impide así la religación del fragmento; y la subunidad Klenow de la DNA polimerasa, que transforma un extremo 3' protuberante de un fragmento de DNA en un extremo romo. Estos enzimas se utilizan como indica la casa comercial que los suministra.

## 11.11 Construcción de plásmidos por recombinación (sistema *gateway*)

La tecnología Gateway (Invitrogen) consiste en un método universal de clonación basado en el sistema de recombinación sitio-específico del bacteriófago lambda (Landy, 1989); que proporciona una manera rápida y altamente eficiente de transferir una secuencia de DNA de interés en diferentes vectores, con el fin de desarrollar análisis funcionales o de expresión proteica.

Las principales ventajas de este método giran en torno a la rapidez y efectividad a la hora de construir clones. Todo ello, sumado a la no necesidad de utilizar enzimas de restricción, purificación y ligación, permite efectuar varias construcciones complejas en un tiempo mínimo.

### 11.11.1 Método de recombinación del fago lambda

El método se basa en la recombinación fago lambda en *E.coli*. Los genes que se desean recombinar están flanqueados por secuencias *att*, que contienen los lugares de unión a proteínas que intervienen en la recombinación. En el fago lambda la secuencia de recombinación es *attP* (243pb), mientras que en *E.coli* es *attB* (25pb). La reacción de **Integración** consiste en la recombinación *attB* x *attP*, que está mediada por proteínas integrasa (Int) del fago lambda, y el factor de integración huésped (Host Integration Factor, IHF) de *E.coli*. Como resultado de la reacción, se crean dos nuevos lugares de recombinación, *attL* y *attR*, flanqueando el profago recombinado, sin la pérdida de secuencia de DNA. La reacción puede llevarse a cabo en sentido opuesto, y se denomina reacción de **Escisión**. Cuando *attL* x *attR* recombinan (reacción mediada por la IHF y la escionasa (Xis)), el lambda-DNA se escinde del genoma de *E. coli*, regenerando el sitio *attB* en *E.coli* y el *attP* en el fago.

En resumen, la reacción es específica y bidireccional:



### 11.11.2 Vectores y sistema Gateway (Invitrogen) de recombinación

El sistema de recombinación lambda ha sido modificado por Invitrogen para generar la tecnología de clonación Gateway. Para generar las construcciones se han usado los protocolos e indicaciones de Invitrogen. Brevemente:

- Se construyen los oligonucleótidos que darán lugar a las secuencias de recombinación *attB1* y *attB2* de modo que mediante una reacción de PCR, flanquearán al gen de interés.

- El **vector donante (pDONOR)** contiene las secuencias *attP1* y *attP2* y se utiliza para clonar el producto de PCR que contiene el gen de interés, flanqueado por las secuencias de

recombinación *aatB*, para generar entry clones. Este vector contiene el gen de resistencia a la Kanamicina y el gen de selección negativa *ccdB*. El gen *ccdB* interfiere con la DNA girasa de *E.coli* ((Bernard et al., 1994)), con lo que inhibe el crecimiento de la mayoría de las cepas de *E.coli*. En esta tesis se ha utilizado el pDONOR 221.

Cuando ocurre el proceso de recombinación (*aatB* x *aatP*), se obtiene un entry clone (pENTR-gen de interés), resistente a la Kanamicina, en el que dicho gen de interés, flanqueado por secuencias *attL1* y *attL2*, elimina al gen *ccdB*.

- Al vector final en el que se desea clonar el gen de interés, se le denomina **pDEST**, o **destination vector**, que presenta resistencia a la ampicilina, contiene el gen *ccdB* y presenta las secuencias de recombinación *attR1* y *attR2*. La recombinación entre el pENTR y el pDEST (*aatL* x *aatR*) resulta en un vector destination (vector de interés), flanqueado por las secuencias de recombinación *attB1* y *attB2*, que contiene el gen de interés y resistente a la ampicilina.

En esta tesis se ha usado el sistema Gateway para la elaboración de vectores lentivirales que contenían las proteínas recombinantes: caveolina-1-RFP (*red fluorescent protein*) y GLUT4-GFP (*green fluorescent protein*) así como las construcciones lentivirales de microRNAs para disminuir la expresión de caveolina-1 y flotilina-1 de ratón.

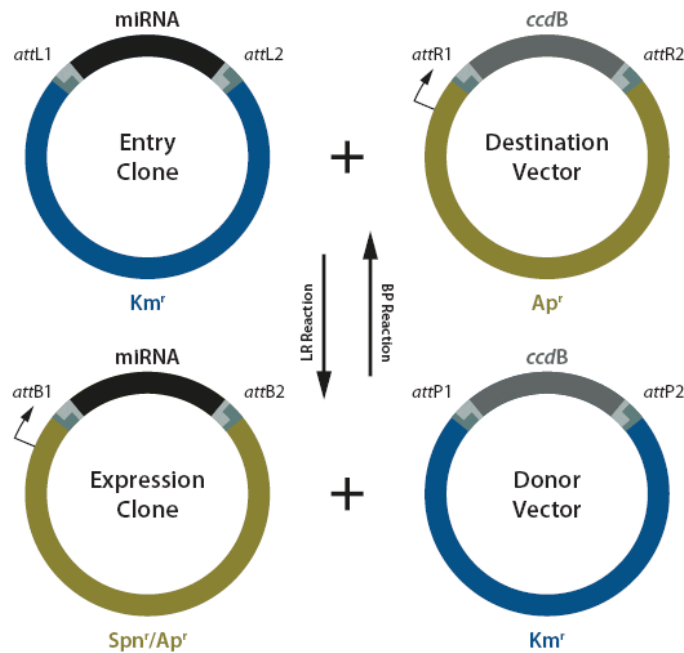


Figura 8. Sistema Gateway de Invitrogen de recombinación. Adaptado de [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)

### 11.11.3 Construcción de entry clones: reacción *attB* x *attP*

El primer paso para construir un entry clone consiste en elaborar las secuencias *aatB* que flanquearán el gen de interés. Las secuencias correspondientes a los oligonucleótidos utilizados son las siguientes:

*attB1* (forward): 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTNN-(GEN)-3'  
*attB1*

*attB2* (reverse): 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTN-(GEN)-3'  
*attB2*

Las cuatro guaninas (G) añadidas al extremo 5' de cada oligonucleótido aumentan la eficiencia de la recombinasa. A continuación se introduce la secuencia *aatB*, seguida de 18-25 pb del gen de interés. La reacción de recombinación producida entre el gen de interés flanqueado por *attB* y el pDONOR (que contiene las secuencias *attP*), resulta en la generación de un entry clone, con resistencia a la ampicilina, que contiene el gen de interés flanqueado por secuencias *attL*. La reacción se lleva a cabo mediante una enzima recombinasa, la **BP clonasa II**, que contiene una combinación de integrasa e IHF. El paquete que contiene la recombinasa, incluye una solución de **proteínasa K** (Invitrogen), que inhibe a la clonasa y favorece el paso subsiguiente de transformación.

Procedimiento:

Se mezclan los siguientes reactivos en un tubo eppendorf:

- |   |                     |
|---|---------------------|
| - Producto de PCR flanqueado por <i>attB</i> (20-50 fmoles) | 1-7µl               |
| - pDONOR (150ng/µl)   | 1µl                 |
| - Tampón TE o agua MilliQ                                   | 8µl (volumen final) |

A continuación se retira la BP clonasa II, guardada a -20°C y se incuba en hielo durante 2 minutos. Seguidamente se agita en un vórtex y se añaden 2µl a la mezcla, de forma que el volumen final de ésta sea de 10µl.

La reacción se incuba a 25°C durante 60 minutos. La reacción se para añadiendo 1µl de solución de proteínasa K e incubándola a 37°C durante 10 minutos.

Finalmente se transforma 1-2µl de la reacción en bacterias competentes mediante choque térmico o electroporación (ver apartado 9.2) y se plaquean los transformantes en placas con LB-agar que contiene 50µg/ml de Kanamicina.

#### 11.11.4 Construcción de los vectores destino: reacción *attL* x *attR*

La recombinación entre un entry clone, que contiene secuencias *attL*, y un *destination vector*, con secuencias *attR*, se lleva a cabo utilizando un enzima **LR clonasa** (Invitrogen), que contiene una combinación de IHF y escionasa (Xis). La mezcla de reactivos consiste en:

- |                             |                      |
|-----------------------------|----------------------|
| - <i>Destination vector</i> | 300 ng               |
| - <i>Entry clone</i>        | 100 ng               |
| - agua MilliQ               | 8 µl (volumen final) |

Con la enzima LR clonasa se procede de la misma manera que con la BP clonasa II, añadiendo 2µl a la mezcla. Tras una incubación a 25°C durante 60 minutos, se añade 1µl de proteínasa K y se incuba a 37°C durante 10 minutos. La transformación se lleva a cabo de la misma manera que en el caso anterior, salvo que en este caso, la selección se realiza con 100µg/ml de ampicilina.

#### 11.12 PCR

La *Polimerase Chain Reaction* (PCR) es una reacción que consiste en la amplificación de un fragmento de DNA a partir de un DNA molde. El enzima responsable de esta amplificación es la DNA polimerasa. En este trabajo se han utilizado dos polimerasas diferentes en función de las características que ofrece cada una: i) la Taq DNA polimerasa (1430-000; Roche), altamente procesiva en dirección 5'-3', sin actividad exonucleasa 3'-5' y estable durante incubaciones prolongadas a elevadas temperaturas; y ii) la Expand High Fidelity Taq polimerase (1732650; Roche), que sí posee actividad exonucleasa 3'→5' y que se utiliza para

amplificar fragmentos de cDNA que deben mantener una elevada fidelidad en su secuencia. Las cantidades de enzima, tampón, DNA molde, dNTPs y oligos se indican en la hoja informativa que acompaña el enzima. La temperatura de fusión de los oligos depende de su  $T_m$  (*melting Temperature*) y la temperatura de extensión es característica de cada polimerasa. En cuanto al tiempo de extensión es recomendable al menos 1 minuto para sintetizar 1 kilobase de DNA, aunque puede variar en función de la polimerasa que se utilice. En la mayor parte de las PCRs realizadas en esta tesis se ha utilizado el protocolo siguiente:

Mezcla:

DNA molde	1 $\mu$ l
10 X Buffer	2 $\mu$ l
dNTPs 10 mM	0.5 $\mu$ l
PrimerF 100 $\mu$ M	0.5 $\mu$ l
PrimerR 100 $\mu$ M	0.5 $\mu$ l
Polimerasa	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	hasta 20 $\mu$ l

Programa:

94° (desnaturalización)	3min	
94° (desnaturalización)	30"	
Temperatura anillamiento	30"	35-40 ciclos
72° (T <sup>a</sup> polimerización)	2min	
72° (elongación final)	5min	
4° bajada de temperatura hasta 4°C		

### 11.13 Secuenciación

Se utiliza para conocer la secuencia de un fragmento de DNA después de una amplificación por PCR, una mutagénesis, una construcción, etc. En este trabajo se ha utilizado el kit comercial *ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction*. Esta reacción consiste en una PCR cuya amplificación es aritmética y en la que se incluyen dideoxinucleótidos fluorescentes. El programa de PCR utilizado se detalla a continuación:

- 30" de desnaturalización a 96° C
- 15" de hibridación a 37° C
- 4 min. de elongación a 60° C, repetido durante 25 ciclos; y bajada final de temperatura hasta 15° C.

Finalizada la amplificación, se procede a la precipitación de la muestra con etanol y EDTA: se añaden 10  $\mu$ l de agua destilada, 63  $\mu$ l de etanol 95% y 5  $\mu$ l de EDTA 125mM, se agita con vórtex y se deja incubando durante 15 min. a temperatura ambiente. A continuación, se centrifuga 20 minutos a 14000 rpm a 4° C, se aspira el sobrenadante y se lava el pellet dos veces con etanol 70%.

Las reacciones de secuencia de esta tesis han sido analizadas por los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Barcelona.

## 12 Obtención y análisis de RNA

### 12.1 Obtención de RNA total

Las técnicas empleadas permiten el aislamiento de RNA total a partir de cualquier tipo de tejido o cultivo celular. La manipulación de las muestras ha de estar dirigida a la prevención de contaminaciones por RNAsas que puedan proceder del medio ambiente o de las manos del manipulador, ya que son ubicuas. Es obligatorio el uso de guantes y de soluciones y recipientes libres de RNAsas.

Todas las soluciones se han preparado con agua tratada con DEPC (ver Apéndice I), se han usado reactivos de uso exclusivo para este tipo de protocolos libres de RNAsas y material de vidrio sometido a esterilización a 200°C al menos durante 4 horas. El material de plástico esterilizado empleado está reservado para este uso exclusivo. El pH de las soluciones se midió con tiras de pH, tomando muestras de la solución y añadiéndoselas a las tiras.

Básicamente se han utilizado dos métodos para la obtención de RNA total. El primero es mediante el reactivo "Trizol" (Invitrogen); el segundo con el kit "RNeasy" (Qiagen). Generalmente se ha usado el primero, y el segundo sólo se usó para comprobar la pureza del RNA obtenido por el primero (como controles) ya que la principal característica del sistema "RNeasy" es el elevado grado de pureza del RNA obtenido mientras que su principal inconveniente es el bajo rendimiento que resulta más elevado por el método de "Trizol".

#### 12.1.1 Aislamiento de RNA total a partir de células mediante el reactivo "Trizol".

El "Trizol" es un reactivo comercial que permite la obtención de RNA a partir de tejidos o cultivos celulares. Consiste en una solución de fenol e isotiocianato de guanidina que preserva la integridad del RNA (ya que inactiva las RNAsas) al mismo tiempo que lisa las células y disuelve sus componentes. La adición posterior de cloroformo seguida de centrifugación, permite la separación de la solución en dos fases, una acuosa (superior) y otra orgánica (inferior). El RNA se mantiene soluble en la fase acuosa, a partir de la cual se precipita con alcohol isopropílico.

Se procede según las instrucciones del producto.

#### 12.1.2 Extracción de RNA mediante el kit "RNeasy" de Qiagen

Este kit permite obtener preparaciones de RNA total de hasta 100µg a partir de células animales ("RNeasy Mini Kit").

El protocolo consiste básicamente en una lisis y homogeneización de las muestras en presencia de isotiocianato de guanidina (potente desnaturizante que preserva la integridad del RNA ya que inactiva las RNAsas). Se añade posteriormente etanol para proporcionar unas buenas condiciones de unión y las muestras se hacen pasar por una columna de gel de sílice que retiene el RNA total (de una longitud superior a 200bases). El paso final consiste en la elución del RNA de alta calidad. El protocolo incluye un paso alternativo de tratamiento con DNasa que permite la digestión del DNA durante el proceso de purificación.

Las moléculas de RNA pequeñas (menos de 200bases) como el RNA 5,8S, 5S y el RNA de transferencia (160, 120 y 90 nucleótidos respectivamente) no se unen a la columna de gel en las condiciones de trabajo, por tanto, estamos enriqueciendo la muestra del RNA recuperado en RNA mensajero.

Procedemos según las instrucciones del producto.

### 12.1.3 Tratamiento del RNA con DNAsas

Cuando es necesario eliminar el DNA de una muestra de RNA se utiliza una DNAsa libre de RNAsas. Hemos utilizado la DNasa I (Ambion). Se añaden 2U de enzima por cada 10 $\mu$ g de RNA y el tampón y agua necesarios para llegar a un volumen entre 20 y 50  $\mu$ l. Es importante no utilizar el vórtex porque la DNasa es un enzima sensible al tratamiento mecánico. Generalmente, una incubación a 37°C durante 30 minutos es suficiente para degradar el DNA contaminante.

## 12.2 Electroforesis del RNA en gel de agarosa-formaldehído

Los geles de agarosa-formaldehído constituyen un sistema de electroforesis desnaturalizante que asegura la migración electroforética del RNA proporcionalmente a su tamaño.

### Material y Reactivos:

- Tampón de electroforesis MOPS 10x: MOPS 400mM pH 7; acetato sódico 100mM y EDTA 10mM. Se guarda a temperatura ambiente y protegido de la luz.
- Gel de agarosa-formaldehído: agarosa 1% en tampón MOPS 1x y formaldehído 0.66M.
- Tampón de muestra 2x: se ha utilizado un tampón comercial (Ambion 1344).
- Bromuro de etidio a 400 $\mu$ g/ml en agua tratada con DEPC.
- Marcador de masas moleculares 0.24-9.5 Kb (Gibco 15620-016).

### Procedimiento:

El portageles, el peine y la cubeta de electroforesis se lavan con etanol y se aclaran con agua tratada con DEPC. Se disuelve la agarosa en tampón MOPS 1x en el microondas. Se deja enfriar un poco (al menos 50° C) y, en la campana extractora, se añade el formaldehído hasta una concentración final de 0.66M (2.7ml de formaldehído 37% en 50 ml de agarosa). Se vierte la mezcla en el portageles con el peine y se deja polimerizando en la campana. A continuación, se coloca en la cubeta cubierto de tampón MOPS 1x.

Para la preparación de las muestras, se pone en un tubo

- 1-2  $\mu$ l RNA
- 1  $\mu$ l de solución de bromuro de etidio
- 5  $\mu$ l de tampón de muestra
- 3  $\mu$ l de agua estéril

El marcador de masas moleculares también se prepara como una muestra más a partir de 1  $\mu$ l del tubo comercial.

A continuación se desnaturalizan durante 5 minutos a 65° C y se cargan en el gel. La cubeta se conecta a 60V durante media hora aproximadamente y luego se visualiza el RNA gracias a la fluorescencia del bromuro de etidio, asociado al RNA, al ser irradiado con luz UV.

## 12.3 Obtención de cDNA a partir de RNA (RT-PCR)

Para diferentes aplicaciones resulta necesario el paso de RNA a cDNA. Es el caso de aplicaciones como la cuantificación del RNA mensajero de un transcrito determinado por PCR a tiempo real, o la amplificación de una determinada secuencia de RNA con la finalidad de clonarla, secuenciarla, etc.

El proceso de obtención de cDNA a partir del RNA se consigue por la acción de una retrotranscriptasa, enzima capaz de sintetizar una cadena de DNA usando RNA como molde,



en presencia de un cebador, que puede ser específico, en caso de querer una secuencia concreta, o inespecífico, es lo que se denomina un oligonucleótido polidT, que hibrida con las secuencias poliA de los RNA mensajeros, o bien, oligonucleótidos degenerados que idealmente permiten la retrotranscripción de todo el RNA.

Con esta finalidad existen distintos *kits* comerciales que incluyen todos los reactivos necesarios. El usado en esta tesis es el de Invitrogen

Procedimos según el protocolo.

Nota: Al finalizar el protocolo se puede proceder a la comprobación de la reacción mediante una PCR con primers específicos que hibriden con el transcrito de algún gen que sepamos que se expresa en la muestra usada (normalmente un gen constitutivo)

## 12.4 Amplificación y detección de DNA mediante PCR a tiempo real

Existen distintos métodos para la cuantificación de la cantidad que se expresa de un determinado RNA mensajero (MRNA) en la célula en un momento concreto. El que se ha usado en esta tesis para comprobar la cantidad de MRNA de distintos marcadores de diferenciación en adipocitos 3T3L1, es la PCR a tiempo real (*real time PCR*).

Brevemente consiste en amplificar una secuencia específica del RNA que se quiere valorar y hacer un seguimiento a tiempo real de la amplificación. Esto se consigue, retrotranscribiendo el RNA de la célula a cDNA previamente a la PCR, y durante ésta, hacer un seguimiento de la reacción midiendo la fluorescencia emitida, ya que en la mezcla de la reacción se incorporan reactivos que emiten fluorescencia al unirse específicamente a la secuencia amplificada (sondas) o bien cuando se intercalan en el DNA de doble cadena (SYBR-Green)

La cuantificación puede ser absoluta o relativa. En la primera se determina el número de copias del RNA valorado, usando como recta patrón un DNA que contiene el fragmento de DNA amplificado a diferentes concentraciones. En la segunda se determina la expresión del RNA valorado en relación a un gen constitutivo cuya expresión no varía con las condiciones experimentales.

En esta tesis, las cuantificaciones que se han realizado son relativas, se han referido a la expresión de los genes *cyclophilinA* y *aRP* (*acidic Ribosomal protein*), y se han realizado usando el sistema "SYBR-Green PCR Master Mix" de "Applied Biosystems" o la sonda para GLUT4 de "Taqman", trabajando en placas de 384 pozos en el aparato ABI 7900HT de los Servicios Científico Técnico de la Universidad de Barcelona.

El procedimiento que se ha seguido es básicamente el indicado por el fabricante del producto, aunque conviene remarcar algunos aspectos importantes.

### 12.4.1 Diseño de los oligonucleótidos cebadores

El diseño y elección de unos buenos cebadores para amplificar los genes que queremos valorar es fundamental para una eficiente cuantificación de su expresión mediante PCR a tiempo real usando el reactivo SYBR Green.

En esta tesis, para el diseño de algunos cebadores se ha usado el programa "PrimerSelect" del paquete "DNASTar", siguiendo los siguientes criterios:

1. El producto amplificado ha de tener una longitud de entre 50-150 pares de bases
2. La hibridación de los cebadores con el cDNA ha de ser lo próximo posible al extremo 3' del cDNA, ya que si se ha usado oligodT, la reacción de retrotranscripción se ha hecho a partir de la cola poliA localizada en el extremo 3' y cuanto más nos alejemos de este punto mayor es la probabilidad de que errores.

3. La temperatura de fusión de los cebadores diseñados por el programa “PrimerSelect” será entre 54 y 58°C, lo cual permite la hibridación de los oligonucleótidos al cDNA diana a una temperatura de 60°C, que es la temperatura a la que la polimerasa del equipo de “SYBR Green” elonga los cebadores

4. Dado que con el uso de “SYBR Green” lo que se valora es el DNA de doble cadena, resulta muy importante evitar la formación de dímeros o *hairpins* de los cebadores.

En el programa que se ha usado, se puede ver un listado de los dímeros que se pueden formar y el valor de  $\Delta G$  de la reacción de formación de éstos. Los cebadores seleccionados tenían que tener una  $\Delta G$  mayor de -3 kcal/mol.

5. Si es posible, se intenta que las 5 bases del extremo 3' no tengan más de 2C o 2G.

6. Se intenta situar los cebadores *forward* y *reverse* en exones diferentes, para evitar amplificaciones de DNA genómico que puedan contaminar la preparación de RNA (aunque las muestras de RNA de partida han sido tratadas con DNasa). Aunque este criterio sólo se aplica si ello no impide que se cumplan los anteriores, más importantes. Además, en los experimentos se incluyen controles negativos de retrotranscripción, es decir, muestras donde la RT-PCR se hizo igual pero no se añadió el enzima retrotranscriptasa.

7. Una vez diseñados los cebadores se comprueba su especificidad mediante la realización de un “BLAST”, seleccionando la base de datos correspondiente a los transcritos de la especie para la que se han diseñado.

#### 12.4.2 Optimización de las condiciones de amplificación

Antes de usar los cebadores/oligos/*primers* para cuantificar la expresión de un determinado transcrito, es necesario valorar las concentraciones óptimas y el rendimiento de la amplificación. Esto se consigue probando la amplificación a partir de 10ng de equivalentes de RNA (cDNA) a diferentes concentraciones de cebadores: 900nM, 600nM, 300nM y 150nM. Se selecciona la menor concentración con la que se obtiene la menor Ct (Ct, *threshold cycle*, se define como el nº de ciclo en que se consigue la emisión de fluorescencia superior a una fluorescencia umbral, fijada significativamente por encima de la línea base de fluorescencia). También se controla la inexistencia de dímeros mediante las curvas de fusión

Una vez determinada la concentración óptima, y si no se observan dímeros, se valora el rendimiento de la PCR con un banco de diluciones seriadas del cDNA de partida: 10ng eq, 5ng eq, 2,5ng eq, 1,25ng eq, 0,625ng eq. Y se determina la pendiente de la relación entre las Cts resultantes y el logaritmo de la concentración. Así, el rendimiento en % de la PCR sería:

$$\text{Rendimiento (\%)} = 100 (10^{-1/m} - 1)$$

Donde m es el valor de la pendiente. Una pendiente de -3,3 representa una amplificación con el máximo rendimiento.

#### 12.4.3 Cebadores y condiciones de la PCR a tiempo real

Para analizar la expresión del RNA mensajero de distintos genes característicos de adipocitos 3T3L1 maduros, realizamos una PCR a tiempo real usando el cDNA obtenido mediante RT-PCR a partir del RNA de los adipocitos y utilizando los siguientes cebadores:

gen	especie	Secuencia cebadores
caveolina-1	mus musculus	forward: AACATCTACAAGCCCAACAACAAGG reverse: GGTTCTGCAATCACATCTTCAAAGTC
caveolina-2	mus musculus	forward: ATGACGCCTACAGCCACCACAG reverse: GCCTAGCTTGAGATGAGAGTTGAG
perilipina	mus musculus	forward: TGCTGGATGGAgACCTC reverse: ACCGGCTCCATGCTCCA
aP2	mus musculus	forward: TTCGATGAAATCACCGCAGA reverse: GGTCGACTTTCCATCCCCTT
HSL	mus musculus	forward: GGCTTACTGGGCACAGATACCT reverse: CTGAAGGCTCTGAGTTGCTCAA
LPL	mus musculus	forward: AGGACCCCTGAAGACAC reverse: GGCACCCAACTCTCATA
CD36	mus musculus	forward: GATGTGGAACCCATAACTGGATTCAC reverse: GGTCCCAGTCTCATTTAGCCACAGTA
GLUT1	mus musculus	forward: CCCCCGCTTCCTGCTCATC reverse: CTGCCGACCCTCTTCTTTTCATCTC
ciclophilinaA	mus musculus	forward: CTTTGA CT TGCGGGCATT TTAC reverse: AAGAACTTCAGTGAGAGCAGAGATTACAGG
aRP	mus musculus	forward: AAGCGCGTCTGGCATTGTCT reverse: CCGCAGGGGCAGCAGTGGT

Las amplificaciones se hicieron en un volumen final de 10 $\mu$ l por pozo de placa de 384 pozos:

- 5,6  $\mu$ l de la mezcla: 5 $\mu$ l de "SYBR-Green PCR Master Mix"  
0,6  $\mu$ l de la mezcla de primers forward y reverse 5 $\mu$ M  
(concentración final 300nM en todos los cebadores usados)
- 4,4  $\mu$ l del cDNA a una concentración final en el pozo de 10ng de equivalentes de RNA/ $\mu$ l

Los 40 ciclos de la PCR se realizan bajo las siguientes condiciones:

- 10' a 95°C
- 15' a 95°C
- 1' a 60°C

Una vez finalizada la amplificación se realizan las curvas de fusión para cada pozo para descartar amplificaciones inespecíficas o formación de dímeros de cebadores.

## 13 Herramientas bioinformáticas

### 13.1 Descripción de las bases de datos utilizadas

**GeneBank.** Es una base de datos de secuencias que pertenece al *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) y dispone de las secuencias de DNA de todas las fuentes públicas disponibles (Benson et al., 1998). Estas secuencias son enviadas directamente por los laboratorios o adquiridas de las bases de datos internacionales como el *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL) o el *DNA Database of Japan* (DDBJ). Cada secuencia de DNA se

acompaña de su secuencia de proteína y de información proporcionada por la fuente que la envía: publicación, localización cromosómica, localización de diferentes motivos funcionales,...etc. Todas las secuencias disponibles se pueden encontrar en *GenBank Database Query Form*: [http://www2.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/query\\_form.html](http://www2.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/query_form.html) Las secuencias nuevas se envían directamente mediante conexión *on line* con el GeneBank a través de la dirección: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BankIt/index.html>.

#### **Expressed sequenced Tags Database (dbEST)**

Los ESTs (*expressed sequence tags*) son secuencias cortas obtenidas de la secuenciación parcial de clones de cDNA seleccionados aleatoriamente de librerías de cDNAs de distintos tejidos y organismos ((Boguski et al., 1993)) introducidas en una base de datos de una división del GeneBank, la *Expressed sequenced Tags Database* (dbEST). En esta base de datos, además aparece información sobre la fuente de librería de cDNA, la longitud del clon de cDNA y la localización cromosómica. Esta información está disponible en la dirección [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/irx/dbST/dbest\\_query.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/irx/dbST/dbest_query.html).

**Ensembl.** Es una base de datos fundada inicialmente por la fundación privada "The Wellcome Trust" y que ahora forma parte de un proyecto común entre el Instituto Sanger y el EMBL-EBI. Dispone de secuencias de DNA genómico de humano, ratón, rata, mosquito, *D. melanogaster*. y *C. elegans*, entre otras. Estas secuencias son proporcionadas por laboratorios que forman parte de los proyectos de secuenciación del genoma, de ESTs y por un intercambio regular de la información de secuencias del NCBI. Además, proporciona información sobre la localización de un gen conocido en el genoma y la predicción de su estructura. Las secuencias se hacen públicas cada semana y son enviadas a <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/TraceArchiveRFC.html>. El acceso puede realizarse *on line* vía <http://www.ensembl.org/>.

**The ExPASy (Expert Protein Analysis System).** Es un servidor que pertenece al Instituto Suizo de Bioinformática (BIS) dedicado especialmente al análisis de secuencias de proteínas y estructuras. Fue creado en 1993 y ofrece acceso libre a un amplio espectro de bases de datos, programas y enlaces que permiten desde la identificación de proteínas hasta la predicción de su estructura y la creación de un modelo 3D. Se accede a través de la dirección <http://us.expasy.org>.

## **13.2 Herramientas para el análisis de secuencias**

#### **Basic Local Alignment Tools (BLAST).**

Los programas BLAST se utilizan para encontrar en las bases de datos secuencias similares de DNA y proteína. Estos programas comparan una secuencia determinada con todas las secuencias de las bases de datos en cualquier combinación posible entre DNA y proteína. Los resultados se muestran como una lista de alineamientos de más o menos calidad entre las secuencias encontradas en la base de datos y la secuencia problema enviada. El tiempo requerido para obtener los resultados es proporcional a los tamaños de la secuencia y de la base de datos utilizada en la búsqueda. Los programas más recientes como el *Gapped Blast* son más sensibles que el BLAST original, ya que dejan pequeños agujeros donde la homología de la secuencia se interrumpe. De esta manera se pueden encontrar con más facilidad secuencias homólogas allá donde hay pequeñas inserciones, deleciones o errores de secuencia. *Gapped BLAST* se encuentra en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/>. Existen diferentes subprogramas que pueden utilizarse en diferentes bases de datos. Las bases de datos utilizadas en este trabajo son las siguientes: (i) "non-redundant" (nr), la cual recopila

secuencias de DNA no redundantes (a partir de ESTs) y secuencias de proteínas (SwissProt, EMBL y secuencias de DNA traducidas que pertenecen al GenBank); (ii) genómico, que comprende todas las secuencias conocidas más o menos ordenadas y localizadas y que hacen referencia al genoma de una determinada especie (en concreto, en este trabajo se han usado las de ratón y humano) y, (iii) dbEST, descrita anteriormente.

- BLASTn, compara secuencias problema de DNA contra base de datos de DNA.
- BLASTp, compara una secuencia de proteína contra bases de datos de proteínas
- BLASTx, traduce una secuencia problema de DNA en las seis posibles pautas de lectura y las compara contra bases de datos de proteínas.
- tBLASTn, compara una secuencia peptídica problema contra les secuencias peptídicas obtenidas de la traducción de bases de datos de DNA (como dbEST).
- tBLASTx, traduce las dos, la secuencia problema de DNA i les secuencias de DNA de les bases de datos y compara todas las secuencias peptídicas resultantes.

**CLUSTAL W.** Este programa compara múltiples secuencias de DNA o proteína y muestra el mejor alineamiento posible. En este trabajo se han utilizado dos accesos al programa diferentes: el Baylor College of Medicine (BCM; <http://dot.imgenbcm.tmc.edu:9331/multi-align/multi-align.html>) que permite alineamientos múltiples hasta de treinta secuencias de DNA o de proteína sin mostrar los residuos conservados, y el European Bioinformatic Institute (EBI; <http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>) que, además de indicar los residuos conservados, calcula la identidad en porcentaje entre las secuencias enviadas.

### 13.2.1 Diseño de oligonucleótidos cebadores

Se ha usado el programa PrimerSelect del paquete “DNASTar” de *Lasergene*. Que permite buscar cebadores sobre una secuencia dada fijando y/o modulando diversos parámetros, como su localización en la secuencia, la longitud del producto de PCR, la temperatura de fusión de los oligonucleótidos, etc.

## 13.3 Otras direcciones de interés

MEDLINE Entrez: base de datos de publicaciones.  
<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/htbinost/Entrez>

Hydrophobicity plots: útil para detectar segmentos transmembrana  
<http://bioinformatics.weizmann.ac.il/hydrophH/plthydrophH.htm>.

Pedro's Molecular Biology tools: uno de los enlaces más completos a páginas utilizadas en Biología Molecular. [http://www.publi.iastate.edu/~pedro/rt\\_all.html](http://www.publi.iastate.edu/~pedro/rt_all.html)

Weizmann Institute Genome and Bioinformatics: <http://bioinfo.weizmann.ac.il>

Sequence interpretation Tools: <http://www.genome.ad.jp/SIT/SIT.html>

The molecular biology database list (Burks et al. 1999)

[http://www.oup.co.uk/nar/Volume\\_27/issue\\_01/summary/gkc105\\_gml.html/](http://www.oup.co.uk/nar/Volume_27/issue_01/summary/gkc105_gml.html/)

## Apéndice I: Soluciones de uso general

### 1. LB

Triptona 1%

Extracto de levadura 0.5%

NaCl 0.5%

Se ajusta el pH a 7.5 con NaOH y se autoclava.

En el caso de preparar LB-agar, se añade agar a 1.5% (w/v) en la botella que contiene el LB justo antes de autoclarlo. Una vez autoclavado, se deja atemperar hasta 50°C. En este momento se añade el antibiótico, si se requiere. Se vierte el medio sobre las placas y se dejan enfriar a temperatura ambiente. Se guardan a 4°C en posición invertida.

### 2. PBS

NaCl 136 mM

KCl 2.7 mM

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 mM

Se ajusta el pH a 7.4. con HCl.

Si se ha de utilizar para cultivos celulares, se autoclava la solución.

### 3. LSB

Se prepara una solución madre de LSBx4:

Tris-HCl 0.4 M, pH 6.8

Glicerol 80% (v/v)

SDS 8% (p/v)

Dilución 1/250 de una solución de azul de bromofenol al 10%

A partir de éste, se obtienen las demás concentraciones por dilución.

### 4. Paraformaldehido (PFA) 3%

La preparación se hace bajo una campana extractora. Para 500ml, se pesan 15g de paraformaldehido, se disuelven en agua bidestilada previamente calentada a 60°C y unas gotas de una solución concentrada de NaOH (ya que el paraformaldehido se disuelve en pH básico). Se añaden 100ml de PBSx5 y se ajusta a 500ml con agua bidestilada. Se hacen alícuotas y se guardan a -20°C.

### 5. Tampón TAE para electroferesis de geles de agarosa (50x)

TrisBase 121g

Ac. Acético-glaciár 28,5ml

EDTA 0,5M 50ml

Agua bidestilada 300,5ml

### 6. TE:

TrisHCl 10mM pH7,5

EDTA 1M

### 7. Agua-DEPC

Agua desionizada (MilliQ de Millipore)

DEPC (dietilpirocarbonato) 0,01%

Incubamos el agua desionizada con el DEPC durante 12 horas a 37°C en agitación. Lo autoclavamos para inactivar el DEPC que podría modificar químicamente las purinas del RNA.

8. Soluciones de cultivos:

- IBMX (sigma I-7018)

Preparamos una solución 100mM.

Resuspendemos 1g de IBMX en 22ml de sosa etanólica (preparada al mezclar 1ml de NaOH 0,5N en 50ml de etanol absoluto). Calentamos la solución a 65°C y lo disolvemos en agitación. Añadimos 22ml de agua bidestilada y lo acabamos de disolver. Preparamos alícuotas de 1ml y las guardamos a -20°C.

- Dexametasona (Sigma D-2915)

Preparamos una solución 0,25mM en agua bidestilada (1,6mg/ml). Preparamos alícuotas de 300µl y las guardamos congeladas a -20°C.

- Insulina (*Crystalline Porcine Insulin Lilly*)

Preparamos una solución de insulina 5mg/ml en HCl 10mM. Guardamos la solución en un tubo a 4°C.

9. Tratamientos de los adipocitos 3T3L1 con agentes que unen o extraen colesterol de la membrana plasmática

- Filipina (Sigma F-9765 Lote 57H4109)

Se prepara una solución madre 5mg/ml en DMSO. Se conserva en alícuotas protegidas de la luz a -20°C.

- Nistatina (Sigma N-3503 Lote 77H0486 )

Se prepara una solución madre 50mg/ml en DMSO. Se conserva en alícuotas protegidas de la luz a -20°C.

- Metil-B-ciclodextrina (MβCD) (Sigma C-4555 )

Se prepara en el momento de utilizarla a una concentración 5mM (5,67 mg/ml) o 10mM (11,34 mg/ml). Se disuelve directamente en el tampón en que se realiza el experimento (medio de ayuno, tampón Krebs-Ringer-Hepes pH7,4)

- β-ciclodextrina (βCD)(Sigma C-4767 )

**4- β-ciclodextrina (βCD)(Sigma C-4767 ):**

Se prepara en el momento de utilizarla a una concentración final de 10 mM (13 mg/ml). Se disuelve directamente en el tampón donde se esté realizando el experimento (medio de ayuno, medio Krebs-Ringer).

## Apéndice II: Anticuerpos utilizados

Proteína diana	Huésped	Procedencia	Dilución western blot
caveolina-1	rabbit	Transduction laboratories	1:500
caveolina-1	rabbit	Santa Cruz Biotechnology	1:500
caveolina-2	mouse	Transduction laboratories	1:250
Flotilina-1	mouse	Transduction laboratories	1:250
GLUT4	rabbit	Dra. Conxi Mora del laboratorio de A. Zorzano	1:500
GLUT1	rabbit	Diagnostic Internationa	1:1000
Perilipina	guinea pig	Upstate biotechnology	1:2000
FAT/CD36	guinea pig	Cedido por Dr. W.Stremmel	1:1000
LPL	chicken	Cedido por Dra. J.Peinado	1:1000
FATP1	rabbit	Cedido por Dr. A.Stahl	1:1000
FATP4	rabbit	Cedido por Dr. A.Stahl	1:1000
SSAO (TK10-79)	rat	Dra. Sirpa Jalkanen	1:2000
Acetil-CoA-Carboxilasa	rabbit	Cell Signaling	1:1000
Receptor de insulina	rabbit	Transduction laboratories	1:500
c-Cbl	mouse	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
Fosfo-tirosina-PY20	mouse	Transduction laboratories	1:1000
IRS-1	rabbit	Cell Signaling	1:500
PI3K p85	rabbit	Upstate biotechnology	1:1000
Akt	rabbit	Cell Signaling	1:1000
Akt-P-serina (ser 473)	rabbit	Cell Signaling	1:1000
Akt-P-treonina	rabbit	Cell Signaling	1:500
Fosfo-MAPKp44/42 (Thr202/Tyr 204)	rabbit	Cell Signaling	1:1000
GSK3	rabbit	Cell Signaling	1:1000
Fosfo-GSK3	rabbit	Cell Signaling	1:1000
PKC $\zeta$	rabbit	Cell Signaling	1:1000
Fosfo-PKC $\zeta$	rabbit	Cell Signaling	1:1000
PPAR $\gamma$	rabbit	Biomol	1:1000
c/EBP $\alpha$	rabbit	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
c/EBP $\beta$	rabbit	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
Sustratos de PKA fosforilados	rabbit	Cell Signaling	1:1000
$\beta$ -actina	mouse	Sigma	1:5000
TC10	rabbit	Abcam	1:1000

## Apéndice III: Plásmidos y construcciones de DNA usados

1. **cav1-pGEM-T easy** (Promega): Esta construcción contiene el inserto, que procede de la amplificación por PCR desde el nucleótido 66 al 1870 del cDNA de caveolina-1 correspondiente a su MRNA transcrito (NM\_007616) de adipocitos 3T3L1, clonado en el vector pGEM-T easy (Promega). Este vector presenta un caset de resistencia a Ampicilina y controla la expresión de la caveolina-1 murina mediante el promotor CMV.



**2. cav1-pCDNA3** : Esta construcción procede de la anterior mediante las dianas Not I en el vector pCDNA3 (Invitrogen). Este vector contiene el promotor CMV, y el gen de resistencia a Ampicilina (resistencia procariota) y otro de resistencia a geneticina (resistencia eucariota).

**3. pCFPC3-GLUT4**: Esta construcción contiene el inserto, que procede de la amplificación por PCR desde nucleótido 10 al 1557 del cDNA del transcrito de GLUT4 de adipocitos 3T3L1, además por PCR se introdujeron las dianas Xho I y EcoR I para clonar el inserto en el vector pCFPC3 de Clontech. Este vector expresa el gen CFP (*cyan fluorescent protein*) bajo el promotor CMV y permite clonar en distintas pautas de lectura (distintos vectores tienen pautas C1, C2 o C3) el inserto de tal manera que se exprese una proteína recombinante CFP-GLUT4. Este vector contiene un gen de resistencia a Kanamicina y a Neomicina.

**4. pGFPC3-GLUT4**: Esta construcción contiene el inserto, que procede de la amplificación por PCR desde nucleótido 10 al 1557 del cDNA del transcrito de GLUT4 de adipocitos 3T3L1, además por PCR se introdujeron las dianas EcoR I y XbaI para clonar el inserto en el vector pGFPC3 de Clontech. Este vector permite expresar la proteína recombinante GFP-GLUT4.

**5. cav1-pYFPN1**: Esta construcción contiene el inserto, que procede de la amplificación por PCR del nucleótido 68 al 609 del cDNA del transcrito de caveolina-1 (corresponde a su ORF), además por PCR se introdujeron las dianas EcoRI y Kpn I para clonar el inserto en el vector pYFPN1 de Clontech. Como en la construcción anterior, el inserto está clonado en pauta de lectura, en este caso en el extremo carboxi terminal de la proteína fusión, generando la proteína recombinante caveolina-1-YFP (*yellow fluorescent protein*).

**6. cav1YFP-pWPXL**: Esta construcción contiene el inserto, procedente de la amplificación por PCR de la proteína recombinante caveolina-1-YFP a partir del vector anterior (nº5: cav1-pYFPN1) donde también se introdujeron por PCR las dianas Mlu I en el extremo 5' de la secuencia de caveolina-1 (nucleótidos 579-583 del vector nº5) y la diana Spe I en el extremo 3' de la secuencia de YFP (nucleótidos 1391-1396 del vector). El inserto se clonó en el vector lentiviral pWPXL (cedido por el doctor D. Trono, [www.tronolab.com](http://www.tronolab.com)) bajo el promotor EF1alpha, que contiene el gen de resistencia a ampicilina.

**7. cav1RFP-pWPXL**: Esta construcción se generó mediante el sistema de recombinación *gateway* de Invitrogen (apartado 11.11 de esta sección). Para ello, se obtuvo el inserto attB1-caveolina-1-RFP-attB2, mediante tres reacciones de PCR: en la primera se amplificó el inserto de caveolina-1 a partir del vector anterior (nº 7) introduciéndole la secuencia de recombinación attB1 en el extremo 5' y los 16 primeros nucleótidos de la secuencia del gen mRFP (*monomeric red fluorescent protein*) en el extremo 3'; en la segunda reacción de PCR se amplificó el inserto del gen mRFP a partir del vector pCDNA3-mRFP cedido por Carme Cortinas del grupo del Dr. Eduard Batlle, introduciendo en el extremo 5' los primeros 16 nucleótidos de la secuencia del gen de caveolina-1, y en extremo 3' la secuencia de recombinación attB2. En la tercera reacción se usaron los productos de las dos reacciones anteriores como DNA molde para amplificar el segmento completo attB1-caveolina-1-RFP-attB2, usando el cebador *forward* de la 1ª reacción de PCR y el *cebador reverse* de la 2ª reacción. Este inserto se clonó como se explica en el apartado 11.11 de esta sección en el vector lentiviral pLenti6/V5dest de Invitrogen.

**8. CFPGLUT4-pWPXL:** Esta construcción contiene el inserto, procedente de la amplificación por PCR de la proteína recombinante CFP-GLUT4 a partir del vector n°3 (pCFPC3-GLUT4) donde también se introdujeron las dianas Pme I en el extremo 5' de la secuencia de CFP (nucleótidos 605-628 del vector n°3) y la diana EcoR I en el extremo 3' de la secuencia de GLUT4 (nucleótido 1557-1562). El inserto se clonó en el vector lentiviral pWPXL (cedido por el doctor Dr. Trono, [www.tronolab.com](http://www.tronolab.com)) bajo el promotor EF1alpha, que contiene el gen de resistencia a ampicilina.

**9. GFPGLUT4-pWPXL:** Esta construcción contiene el inserto, procedente de la amplificación por PCR de la proteína recombinante GFP-GLUT4 a partir del vector pGFP-GLUT4 (n°4 de esta lista) donde también se introdujeron las dianas Pme I en el extremo 5' y EcoR I en el extremo 3'. El inserto se clonó en el vector lentiviral pWPXL (cedido por el doctor Dr. Trono, [www.tronolab.com](http://www.tronolab.com))

**10. HA-cav3<sup>DGV</sup>-pWPXL:** Esta construcción contiene el inserto, procedente de la amplificación por PCR desde el nt 480 al 1773 del cDNA del transcrito de caveolina-3 de adipocitos 3T3L1 (NM 007617), además, introduzco la secuencia de inicio de transcripción ATG y el epítipo HA (YPYDVPDYA). Las dianas MluI y Spel también fueron introducidas por PCR. El inserto se clonó en el vector lentiviral pWPXL.

**11. cav1siRNA-pLVTH:** Estas construcciones se generaron como se describe en el apartado 2.3 de esta sección. Se clonaron las secuencias de oligonucleótidos (que generarán los dúplex de RNA (siRNA) mediante las dianas Mlu I y Cla I en el vector pLVTH cedido por el doctor D. Trono, [www.tronolab.com](http://www.tronolab.com)).

**12. cav1miRNA-pLenti6/V5dest:** Las secuencias de los miRNA de caveolina-1 se diseñaron usando el programa informático de Invitrogen (BLOCK-iT™ RNAi Designer) usando los cDNA de caveolina-1 NM\_007616. Tal y como se indica en el apartado 2.1 del anexo. Estas secuencias se clonaron en el vector pCDNA 6.2 EmGFP-miRNA de Invitrogen usando la diana Bsa I.

Estos vectores, que son compatibles con el sistema *gateway* de Invitrogen de construcción de plásmidos por recombinación (apartado 11.11 de esta sección), se usaron para generar los vectores lentivirales pLenti6/V5dest mediante recombinación.

**13. flot1miRNA-pLenti6/V5dest:** Las secuencias de los miRNA de caveolina-1 se diseñaron usando el programa informático de Invitrogen (BLOCK-iT™ RNAi Designer) usando los cDNA de flotilina-1 (NC\_000083.1). Estas secuencias se clonaron en el vector pCDNA 6.2 EmGFP-miRNA de Invitrogen usando la diana Bsa I. Estos vectores se usaron para generar los vectores lentivirales pLenti6/V5dest mediante recombinación.

**14. cav1flot1miRNA-pLenti6/V5dest:** Para generar estos vectores que expresan tanto las secuencias miRNA de caveolina-1 como de flotilina-1, a partir de los vectores pCDNA6.2EmGFP intermediarios de los vectores n° 12 y 13, digerimos con las dianas BamH I y Xho I el vector pCDNA6.2EmGFP- cav1miRNA para extraer el inserto cav1miRNA, que fue clonado en el vector pCDNA 6.2 EmGFP-flot1miRNA previamente digerido con las dianas Bgl II y Xho I. Este vector pCDNA 6.2 EmGFP-flot1miRNAcav1miRNA se usó para generar los vectores lentivirales pLenti6/V5dest mediante recombinación.