

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

**ANEXO**



# 1 Generación de líneas de preadipocitos 3T3L1 deficientes en caveolina-1 y en flotilina-1

Los sistemas de “silenciamiento génico posttranscripcional” han evolucionado en el transcurso de esta tesis doctoral. Así, como se explicó brevemente en el apartado 2 de la sección Resultados, el RNA de doble cadena puede inducir un silenciamiento secuencia-específico en eucariotas. Este proceso de silenciamiento se inicia cuando el RNA de doble cadena (RNAdc) largo es procesado a RNA pequeño de 21 a 26 nucleótidos mediante la enzima RNAsa III Dicer. Estos RNA pequeños se incorporan a complejos efectores de silenciamiento, que son guiados a secuencias complementarias diana. Existen diferentes tipos de silenciamiento, cuyas diferencias se basan principalmente en la naturaleza de la secuencia diana y en la composición proteica de los complejos efectores. La ruta del RNA de interferencia (RNAi) se inicia cuando Dicer genera pequeños RNA de interferencia (siRNA) que se unen por complementariedad al mRNA para su degradación, utilizando el complejo RISC. De manera natural, los siRNA se originan de transposones y virus que producen RNAdc durante su replicación, así como también de otras secuencias repetidas transcritas bidireccionalmente. Algunas de las enzimas que conforman la maquinaria del RNAi como Dicer, entre otras, son codificadas por familias multigénicas en varias especies y también participan en otros mecanismos de silenciamiento mediado por RNA. Los microRNA son otros RNA pequeños que pueden inducir silenciamiento al unirse al mRNA. Éstos se generan de manera general cuando Dicer procesa estructuras de horquilla compuestas de regiones no codificantes, en genomas de plantas y animales. Los miRNA se incorporan a un complejo similar a RISC y, dependiendo de su grado de complementariedad con el mRNA diana, pueden tener represión traduccional o bien digerir el mRNA. El silenciamiento mediado por miRNA es esencial para el desarrollo de plantas y animales. La inducción artificial del RNAi mediante siRNA o miRNA ha sido adoptada como una herramienta para inactivar la expresión génica, tanto en células en cultivo como en organismos vivos.

Diferentes casas comerciales, como Ambion e Invitrogen, han desarrollado todo un conjunto de herramientas (programas informáticos, vectores, etc.) para provocar el silenciamiento génico posttranscripcional de manera muy eficiente usando miRNA.

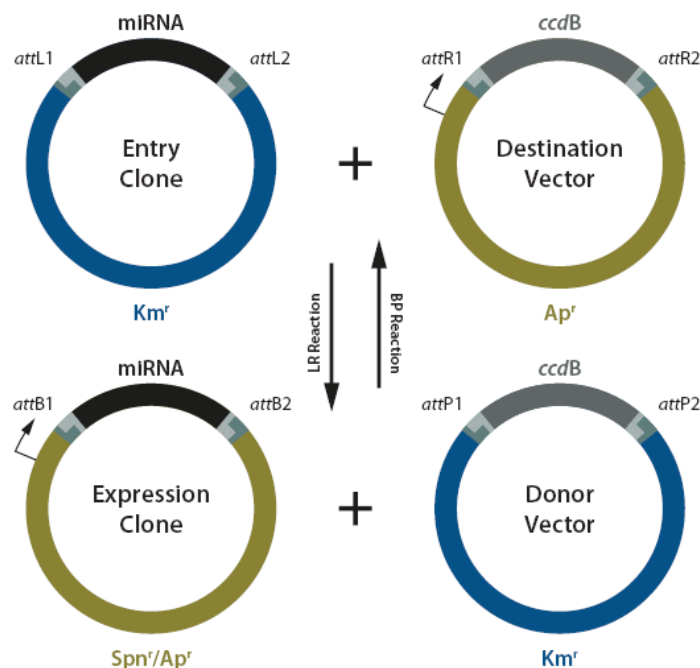
Nos planteamos por tanto usar esta técnica de silenciamiento para disminuir la expresión tanto de caveolina-1 (para tratar de conseguir una disminución de la caveolina-1 aún más eficiente que la lograda con los siRNA) como de flotilina-1 en los adipocitos 3T3L1, ya que la flotilina-1 es otro componente esencial de los *rafts* lipídicos (Bickel et al., 1997; Lang et al., 1998; Volonte et al., 1999; Stuermer et al., 2001; Souto et al., 2003; Langhorst et al., 2005; Rajendran et al., 2007)

## 1.1 Selección de las secuencias de miRNA y clonaje en vectores lentivirales

Las secuencias de los miRNA se diseñaron usando el programa informático de Invitrogen (BLOCK-iT™ RNAi Designer) usando los cDNA de caveolina-1 y de flotilina-1 (NM\_007616 y NC\_000083.1).

Estas secuencias se clonaron en el vector pCDNA 6.2 EmGFP-miRNA de Invitrogen. Este vector, a diferencia del pLVTH empleado para generar los siRNA en el apartado 2 de los resultados, presenta el sistema de expresión a partir de la polimerasa II (no la polimerasa III), más eficiente, además permite la expresión policistrónica de varios miRNAs (antes conseguíamos la expresión de un solo siRNA por promotor), la proteína GFP también se expresa en estos vectores, y además lo hace bajo el mismo promotor (no en un casete

independiente) de tal manera que esta proteína nos indica, no sólo la entrada del vector, sino la expresión del miRNA. Estos vectores además nos interesaron porque son compatibles con el sistema “Gateway® DEST vectors” también de Invitrogen (ver apartado 11.11 de la sección Materiales y Métodos) que permite clonar de manera altamente eficiente lo que se ha clonado en el vector descrito en toda una serie de vectores destino, entre ellos existen vectores lentivirales como el pLenti6/V5-DEST™, mediante dianas de recombinación en lugar de usar dianas de restricción. Brevemente, consiste en que las secuencias de los miRNA diseñadas, son clonadas en los denominados Gateway® entry vector (pCDNA 6.2 EmGFP-miRNA) que tienen unas dianas de recombinación (attB) que permiten, mediante una reacción sencilla usando la enzima BP clonasa™ la transferencia por recombinación del casete al vector pDONOR™. Generando lo que se llama “entry clone”. Mediante una segunda reacción de recombinación catalizada por la LR clonasa™ conseguimos transferir el casete original al vector destino, en nuestro caso el lentivector pLenti6/V5-DEST™. Los protocolos empleados para realizar estas reacciones son los descritos por Invitrogen (Gateway® technology: número de catálogo 12535-019 y 12535-027)



Una vez generados los vectores destino (pLenti6/V5-DEST™) se procedió como en el apartado 2 de la sección Resultados a la producción de las partículas lentivirales mediante la coexpresión de elementos de empaquetamiento del virión y el genoma del vector, en una célula usada como “productora”, la línea celular Hek293T. Así, para producir los lentivirus procedimos como se explica en el apartado 3.1 de la sección Materiales y Métodos, cotransfectando, en las células productoras, tres vectores:

- El vector pLenti6/V5-DEST™, donde tenemos el casete GFP-miRNA
- El vector pCMVdR8.74 (*Packaging system*)
- El vector pMD2G (*envelope element*)

## 1.2 Infección de los preadipocitos 3T3L1 y detección de la expresión de caveolina-1 y flotilina-1

De nuevo, como en apartado 2.2 de la sección Resultados, las partículas lentivirales producidas, se titularon en células Hek293 (mediante el análisis por citometría de flujo del porcentaje de células que expresan GFP) y el título volvió a ser de  $10^7$ - $10^8$  unidades infectivas/ml.

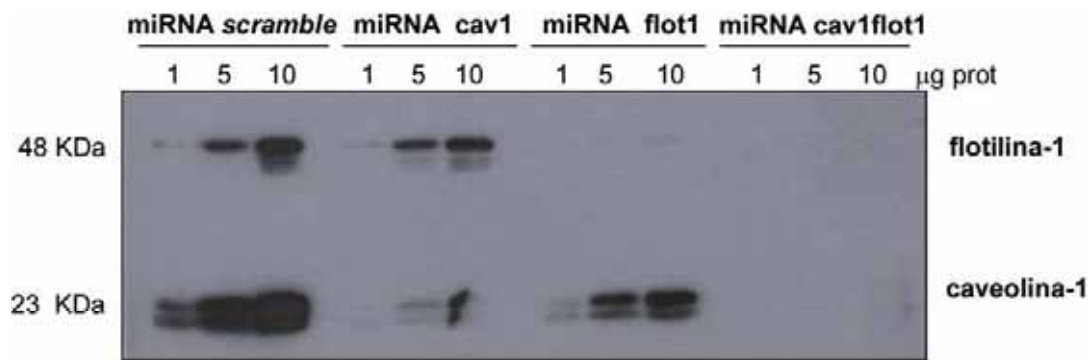
Para infectar los preadipocitos 3T3L1 tuvimos en cuenta todo lo analizado en el apartado 2.3 de la sección Resultados respecto a la multiplicidad infectiva usada y la eficiencia en la transducción y en el silenciamiento, de tal manera que usamos una multiplicidad infectiva (MOI) de 60. De esta manera obtuvimos un porcentaje de transducción elevado (95%) tal y como esperábamos usando esta MOI de virus. De la misma forma que en el apartado 2.3 de los resultados, se usó la metodología FACS (*fluorescence activated cell sorting*) para seleccionar los preadipocitos transducidos y que además expresaran la proteína GFP con la misma intensidad. Generamos así, de nuevo, líneas de preadipocitos 3T3L1 con las partículas víricas integradas en el genoma que expresaran los RNA de doble cadena (miRNA) que disminuyeran la expresión de caveolina-1, flotilina-1 y de ambas proteínas en la misma célula.

Sometimos a los preadipocitos obtenidos al proceso de diferenciación tal y como se indica en el apartado 1.8 de la sección Materiales y Métodos, y comprobamos la eficiencia del silenciamiento mediante *western blot* usando los homogenados celulares de las distintas líneas de adipocitos.

Como se puede ver en la figura 1, en todas las líneas obtenidas conseguimos disminuir la expresión de la proteína: caveolina-1, flotilina-1 o ambas, aunque en el caso del doble silenciamiento la eficiencia fue la máxima.

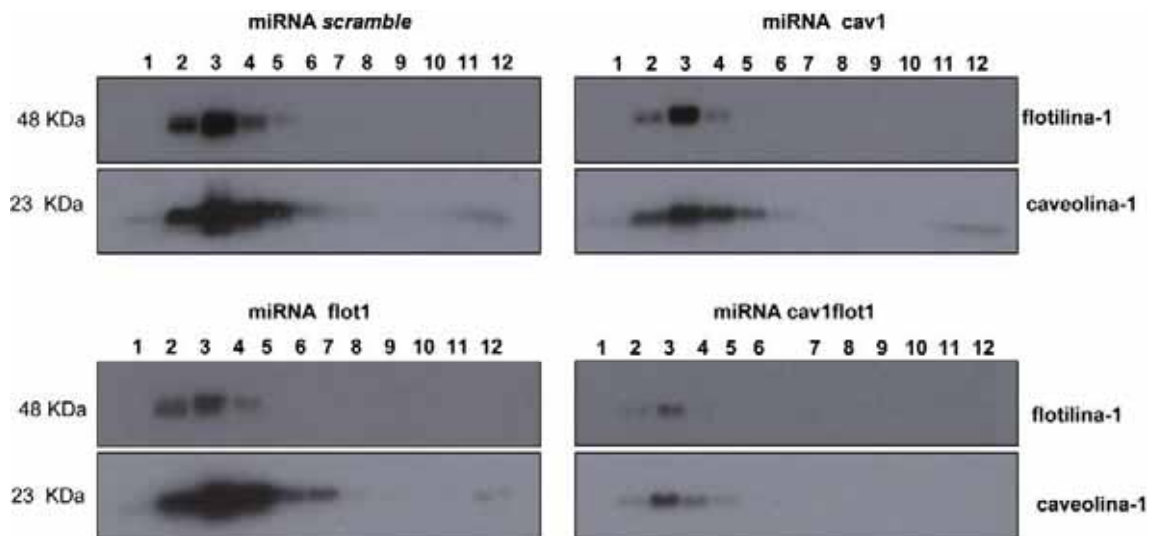
Hemos desarrollado, por tanto, otra herramienta para estudiar los *rafts* lipídicos/caveolas en ausencia o deficiencia (ya que aunque provocamos una disminución importante de la expresión de estas proteínas, aún se siguen expresando en los adipocitos) de dos proteínas que forman parte de estos dominios de la membrana.

Se analizó también la distribución de caveolina-1 y flotilina-1 a lo largo de un gradiente de sacarosa discontinuo tras la extracción con Tritón-X-100, de manera similar a lo realizado en el apartado 3.2.1 de la sección resultados, cuando analizamos los *rafts* lipídicos en ausencia de caveolina-1. Como se observa en la figura 2, en todas las líneas celulares generadas, caveolina-1 y flotilina-1 se localiza en las fracciones ligeras del extracto celular, que se corresponden a *rafts* lipídicos. (Rajendran *et al.*, 2007) encontró el mismo resultado en MEFs de ratones *cav1*<sup>-/-</sup>.



	% cav1	%flot1
<b>scramble</b>	100	100
<b>miRNA cav1</b>	15	90
<b>miRNA flot1</b>	84	11
<b>miRNA cav1flot1</b>	5,4	4,7

**Figura 1.** Expresión de caveolina-1 y flotilina-1 en adipocitos 3T3L1 maduros que expresan miRNAs contra caveolina-1, flotilina-1 o contra ambas proteínas simultáneamente. Los distintos grupos de adipocitos que expresan miRNAs específicos contra caveolina-1(miRNA cav1), flotilina-1 (miRNA flot1), ambas proteínas simultáneamente (miRNA cav1flot1) o *scramble* (secuencia desordenada que no provoca la degradación de ninguna proteína de adipocitos) fueron lisados en tampón A-Igepal 1% (ver apartado 6.1 de la sección materiales y métodos). Se cuantificaron las proteínas de los homogenados de cada grupo de células y se cargaron cantidades crecientes de proteína para realizar el SDS-PAGE. La expresión de las proteínas caveolina-1 y flotilina-1 se valoró mediante western blot usando anticuerpos anti-caveolina-1 y anti-flotilina-1. El valor obtenido de la densitometría de cada una de las bandas se relacionó con la cantidad de proteína de la que se partió y así se estimó la cantidad de caveolina-1 presente en cada grupo de lisados. En la tabla se muestra el porcentaje de caveolina-1 y flotilina-1 presente en cada homogenado respecto a las células infectadas con el lentivirus miRNA *scramble*.



**Figura 2.** Localización de las proteínas caveolina-1 y flotilina-1 en las fracciones procedentes del gradiente de sacarosa tras la extracción con Tritón-X-100 1% en adipocitos *scramble* y deficientes en caveolina-1, flotilina-1 o ambas proteínas. Los distintos grupos de adipocitos se homogeneizaron en presencia de Tritón-X-100 al 1% y se centrifugaron en un gradiente discontinuo de sacarosa (apartado 6.4.1 de la sección Materiales y Métodos). El mismo volumen de cada muestra (30 µl) de cada fracción (de la 1 a la 12) se analizó por western blot usando los anticuerpos anti-caveolina-1 y anti-flotilina-1.

Este resultado es similar al obtenido en el apartado 3.2 de la sección Resultados de esta tesis, donde encontramos que la disminución de la expresión de caveolina-1 no afectaba a la presencia de *rafts* lipídicos en la membrana plasmática. Sin embargo, para sacar alguna conclusión a partir estas líneas celulares deficientes en caveolina-1 y flotilina-1, quedan por analizar en profundidad la presencia y características de los *rafts* lipídicos, tal y como se realizó en el apartado 3 de la sección Resultados de esta tesis.

Sería interesante además, analizar la señalización de la insulina en las células deficientes en caveolina-1 y flotilina-1, ya que, como se ha descrito en la introducción de este trabajo y posteriormente se ha discutido en el apartado 5.1 de la sección discusión, la flotilina-1 participa en la vía de señalización de la insulina c-Cbl/Tc10 asociada a caveolas. Esta vía, se definió como fundamental la acción de la insulina provocando la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática (Baumann *et al.*, 2000;Chiang *et al.*, 2001) aunque este papel ha sido motivo de controversia, y otros autores (Zhou *et al.*, 2004;Mitra *et al.*, 2004) no niegan la existencia de esta vía pero no le dan un papel en la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática. Podríamos, por tanto, analizar el efecto de alterar esta vía de señalización en los adipocitos deficientes en caveolina-1 (que carecen de caveolas) y flotilina-1.

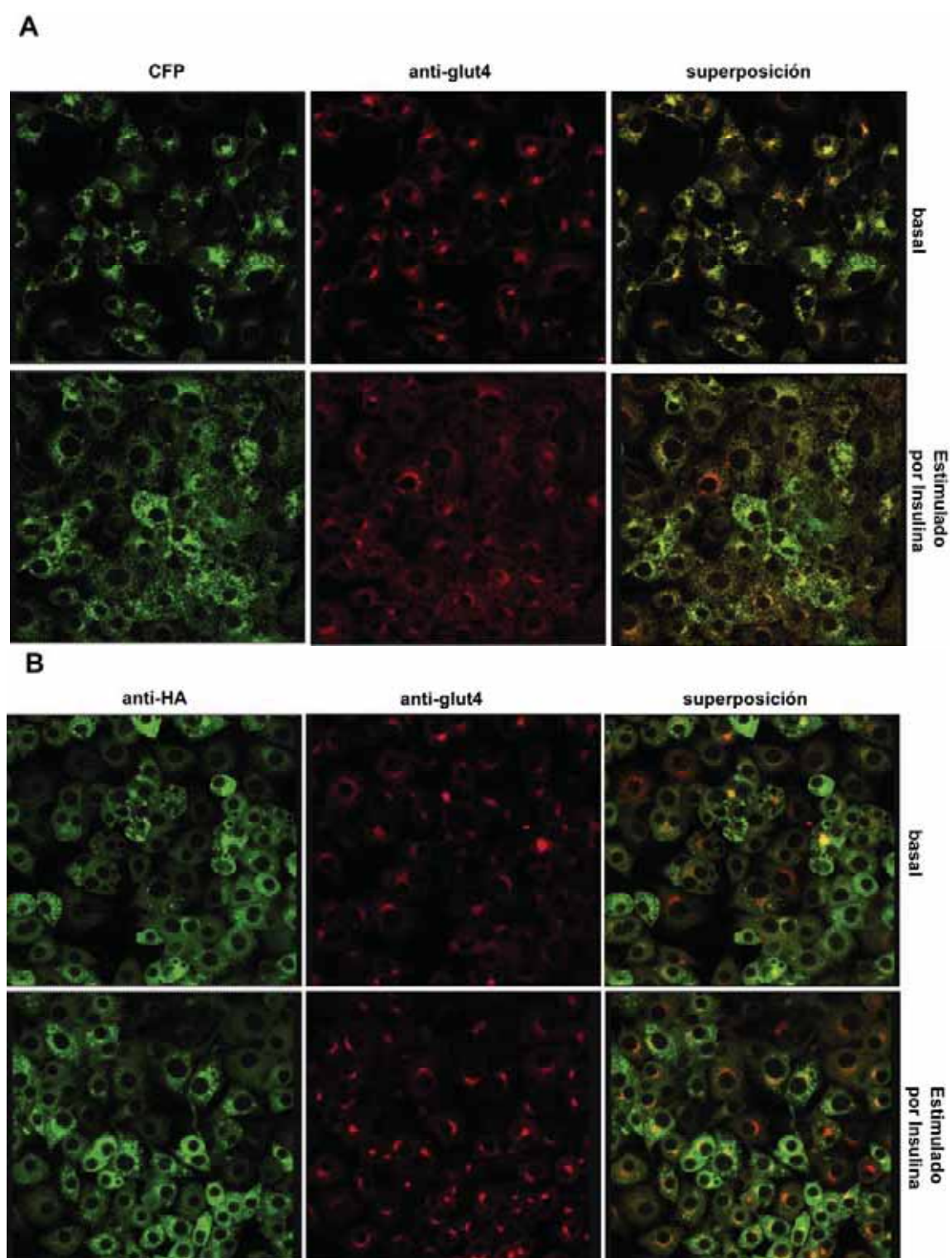


## 2 Infección de preadipocitos y adipocitos 3T3L1 con partículas lentivirales que codifican proteínas recombinantes

La transferencia de material genético a la línea celular 3T3L1, con la que hemos trabajado durante el desarrollo de esta tesis, presenta una baja eficiencia con los métodos tradicionales de transfección: método de fosfato cálcico, PEI, reactivos comerciales como *Fugene* o *Lipofectamina* de Invitrogen. Como se ha descrito en el apartado 2.2 de la sección Resultados, en esta tesis nos planteamos la introducción de material genético en los adipocitos 3T3L1 mediante la transducción usando partículas lentivirales. Esta técnica se usó para transducir eficientemente preadipocitos 3T3L1 usando lentivirus que permitían la expresión de siRNAs. Sin embargo, como se explica en el apartado 2.2 de la sección Resultados, usando estos lentivirus-siRNA no conseguimos infectar eficientemente adipocitos 3T3L1 maduros. Sin embargo, cuando utilizamos otros vectores lentivirales construidos para expresar proteínas recombinantes: caveolina-1-YFP (*yellow fluorescent protein*), caveolina-1-RFP (*red fluorescent protein*), (*cyan fluorescent protein*) CFP-GLUT4, (*green fluorescent protein*) GFP-GLUT4, o HA-cav3<sup>DGV</sup> la eficiencia de la transducción de adipocitos 3T3L1 fue alta (80-90%).

Nos planteamos analizar tanto que estas proteínas exógenas se expresan, como que son funcionales tras su sobreexpresión en los adipocitos. Para estudiar las proteínas recombinantes GLUT4-CFP y HA-Cav3<sup>DGV</sup> analizamos la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática tras la estimulación por insulina (ver apartado 5.3 de la sección Resultados), ya que este comportamiento es característico de este transportador de glucosa en los adipocitos. Usamos el mismo tipo de ensayo para comprobar la funcionalidad del constructor HA-cav3<sup>DGV</sup> ya que se ha descrito que este dominante negativo disminuye notablemente la cantidad de colesterol y caveolina-1 en la membrana plasmática, inhibiendo así la vía de señalización de la insulina que estimula la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática (Tesis doctoral de la Dra. Anna Ros Baró, (Roy *et al.*, 1999; Pol *et al.*, 2001)).

En la figura 3 se muestran imágenes de adipocitos maduros transducidos usando partículas lentivirales que permiten expresar las proteínas recombinantes GLUT4-CFP y HA-Cav3<sup>DGV</sup>. En la figura 3 A, observamos como la proteína fusión GLUT4-CFP responde a la estimulación por insulina, translocando a la membrana plasmática desde compartimentos intracelulares (donde permanece en estado basal) de la misma manera que lo hace la proteína GLUT4 endógena. En la figura 3 B, observamos como los adipocitos que expresan el dominante negativo HA-Cav3<sup>DGV</sup> presentan un marcaje de GLUT4 intracelular tanto en estado basal como después de la estimulación con insulina, tal y como ha sido descrito por la Dra. Anna Ros y por los autores (Roy *et al.*, 1999; Pol *et al.*, 2001).

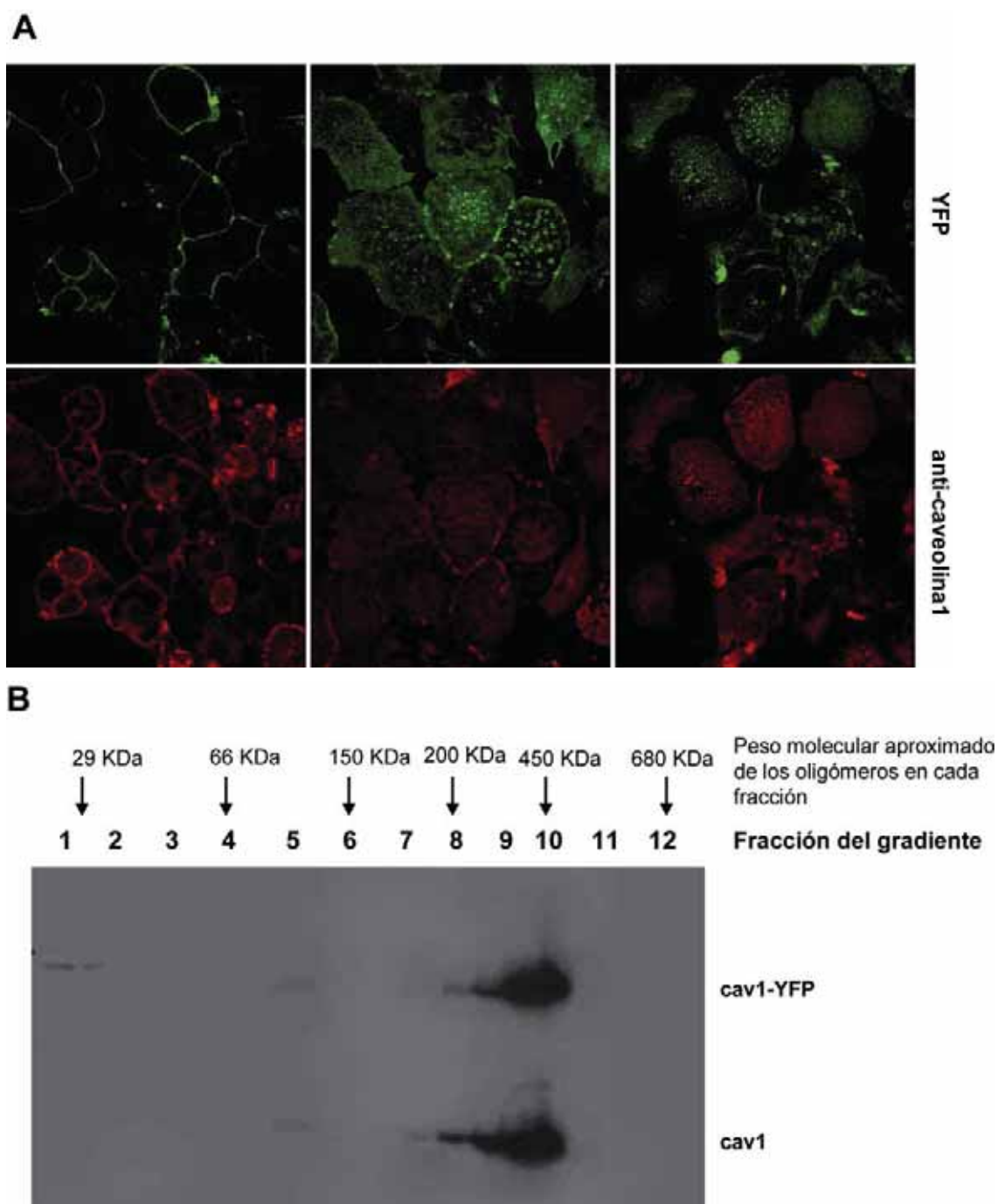


**Figura 3. Acción de la insulina sobre la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática en adipocitos 3T3L1 transducidos con partículas lentivirales que expresan las proteínas GLUT4-CFP (A) y HA-Cav3<sup>DGV</sup> (B).** Preadipocitos 3T3L1 crecidos en cubreobjetos fueron diferenciados tal y como se explica en el apartado 1.8 de la sección Materiales y Métodos. El día 6 del proceso de diferenciación los adipocitos se infectaron usando 10 MOI de las partículas lentivirales generadas a partir de los vectores CFPGLUT4-pWPXL (A) y HA-cav3<sup>DGV</sup>-pWPXL (B) (ver apéndice III de la sección Materiales y Métodos) como se indica en el apartado 3.3 de la sección Materiales y Métodos. Tras 3-4 días los adipocitos se ayunaron durante 2 horas y posteriormente se incubaron en ausencia (basal) o en presencia de insulina 100nM durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, las células se fijaron con paraformaldehído 3% y se realizó una inmunolocalización de GLUT4 (A) y/o del epítipo HA (B), usando un anticuerpo primario policlonal anti-GLUT4 o anti-HA y un anticuerpo secundario conjugado al fluorocromo AlexaFluor568. Las imágenes se capturaron usando un microscopio confocal.

Para estudiar la construcción caveolina-1-YFP en los adipocitos 3T3L1 infectados, por un lado observamos su expresión y localización en estos adipocitos, y por otro comprobamos que esta proteína recombinante oligomeriza de la misma manera que caveolina-1 endógena formando complejos de 14-16 moléculas de caveolina-1 de aproximadamente 350 kDa de peso molecular (Sargiacomo *et al.*, 1995; Monier *et al.*, 1996; Song *et al.*, 1997). Para ello, procedimos como describen los autores (Sargiacomo *et al.*, 1995; Scherer *et al.*, 1996; Song *et al.*, 1997) realizando un análisis de la velocidad de migración en un gradiente de sacarosa, mediante la solubilización de los extractos celulares con octilglucósido y sometidos a ultracentrifugación (340.000 g durante 10 horas) sobre un gradiente de sacarosa continuo (5-40%). De esta manera, los oligómeros de mayor peso molecular migran a fracciones más densas del gradiente de sacarosa (más alejadas de la superficie del tubo).

Como se puede observar en la figura 4 A, la proteína recombinante caveolina-1-YFP, se localiza en la membrana plasmática de manera semejante a caveolina-1 endógena (ver figura 15 y 16 de la sección Resultados). En la figura 4 B, observamos como tanto caveolina-1 endógena como la proteína fusión caveolina-1-YFP aparecen mayoritariamente en las fracciones de mayor peso molecular del gradiente de sacarosa, sugiriendo que ambas proteínas forman oligómeros de 200-450 kDa.

En las figuras 3 y 4, podemos ver como conseguimos transducir eficientemente adipocitos 3T3L1, usando lentivirus que permiten la expresión de transgenes. Además, hemos observado por un lado, que los adipocitos no parecen verse alterados por la infección: su morfología es semejante a la de los adipocitos sin infectar y no se desenganchan del sustrato. Este resultado es muy interesante ya que en nuestro grupo, cuando sobreexpresamos proteínas en adipocitos 3T3L1 mediante electroporación (el único método de sobreexpresión en adipocitos con el que, hasta ahora, se trabajaba en nuestro grupo, y cuya eficiencia de transfección es del 10-30%), la membrana de los adipocitos resulta afectada y muy sensible a la lisis, y los adipocitos se desenganchan fácilmente del sustrato. Por otro lado, los resultados indican que las proteínas sobreexpresadas se comportan como las proteínas endógenas y/o como se ha descrito anteriormente en la bibliografía (dominante negativo HA-cav3<sup>DGV</sup>).



**Figura 4. Análisis de la proteína fusión caveolina-1-YFP.** Preadipocitos 3T3L1 crecidos en cubreobjetos (A) o en placas de 10cm Ø (B), fueron diferenciados tal y como se explica en el apartado 1.8 de la sección Materiales y Métodos. El día 6 del proceso de diferenciación los adipocitos se infectaron usando 10 MOI de las partículas lentivirales generadas a partir del vector cav1YFP-pWPXL (ver apéndice III de la sección Materiales y Métodos) como se indica en el apartado 3.3 de la sección Materiales y Métodos. Tras 3-4 días los adipocitos en las células: se fijaron con paraformaldehído 3% y se realizó una inmunolocalización de caveolina-1 (A), usando un anticuerpo primario anti-caveolina-1 o anti-HA y un anticuerpo secundario conjugado al fluorocromo AlexaFluor568. Las imágenes se captaron usando un microscopio confocal. (B) Análisis de la velocidad de migración de caveolina-1 endógena y caveolina-1YFP a lo largo de un gradiente continuo de sacarosa. Los adipocitos, 3-4 días después de la infección se solubilizaron en un tampón que contenía octilglucósido (ver apartado 6.5 de la sección Materiales y Métodos) y se cargaron en la superficie de un gradiente continuo de sacarosa (5-40%). Las muestras se centrifugaron a 340.000 g durante 10 horas. Las distintas fracciones del gradiente se recogieron desde la superficie del tubo (menos densa). A 30µl de cada fracción se añadió LSB 4X y se analizaron por SDS-PAGE y western blot, usando un anticuerpo anti-caveolina-1. Las flechas marcan la posición de estándares de peso molecular (anhidrasa carbónica: 29 kDa; BSA: 66 kDa; alcohol deshidrogenasa: 150 kDa; β-amilasa: 200 kDa; apoferritina: 443 kDa)

La expresión de las proteínas fusión caveolina-1-RFP y GFP-GLUT4 en adipocitos 3T3L1 fue generada, para estudiar la relación entre ambas proteínas: mediante técnicas de microscopía confocal y electrónica y analizar así su colocalización en caveolas, o estudiar la implicación de caveolina-1 en la translocación a la membrana plasmática /endocitosis de GLUT4 mediante videomicroscopía o microscopía confocal a tiempo real (*time-lapse videomicroscopy*)

Las construcciones caveolina-1-YFP y CFP-GLUT4 se diseñaron para realizar analizar la proximidad y posible interacción entre caveolina-1 y GLUT4 mediante la técnica FRET (*fluorescence resonante energy transfer*). Esta técnica se basa en la transferencia de energía no radiactiva entre dos cromóforos. Los fluoróforos CFP y YFP son una pareja de proteínas fluorescentes derivadas de GFP (*green fluorescent protein*) muy usadas para esta técnica, ya que la proteína donante (CFP) es excitada a una longitud de onda (440nm) a la que YFP no se excita, y el pico de emisión fluorescente de esta proteína coincide con el pico de excitación de la proteína YFP. Sólo cuando las dos proteínas están a una distancia inferior a 10nm y en la orientación adecuada, la transferencia de energía es significativa y una gran parte de la energía procedente de la emisión de CFP se transfiere a YFP y genera un pico de emisión de YFP mucho mayor.